

Kalcium szabályozta sejtosztódás és túlélés vizsgálata mielo- eritroid sejtekben

Doktori (Ph.D.) értekezés

Jánossy Judit, Okleveles Biológus

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNY EGYETEM, TERMÉSZETTUDOMÁNY KAR

Biológia doktori iskola vezető: Erdei Anna Ph.D., D.Sc. tanszékvezető egyetemi tanár, az
MTA lev. tagja

Molekuláris sejt- és neurobiológia program: Dr. Sass Miklós D.Sc. egyetemi tanár

2008.

Témavezetők: Dr. Friedrich Péter, MTA rendes tagja

Dr. Tompa Péter, Biológia Tudomány Doktora

Készült a Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ Enzimológiai
Intézetében, Budapest

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK	5
1 IRODADALMI ÁTTEKINTÉS	8
1.1. Az intracelluláris kalcium szintek változtatása és annak hatása	8
1.2. A sejtosztódás és túlélés szabályozása	9
1.2.1. Kalcium szerepe a sejtosztódás folyamatában, a sejtciklus fázisai és szabályozása	9
1.2.2. A MAPK jelátviteli útvonalak	11
1.3. A kalpain aktiválódása, és szerepe a sejtek életében	13
2.1 A TF-1 sejtvonal jellemzése	15
2. CÉLKITŰZÉSEK	17
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	18
3.1.1. A felhasznált anyagok forrásai	18
3.1.2. A sejtvonal jellemzése, a sejt kultúra fenntartása és a kezelések körülményei	18
3.1.3. Az intracelluláris szabad $[Ca^{2+}]$ meghatározása	19
3.1.4. A sejtszám és életképesség meghatározása	19
3.1.5. Kaszpáz-3 aktivitás mérése	19
3.1.6. DNS létra kimutatása	20
3.1.7. A sejtek lízálása és a fehérje preparátumok készítése, Western-blot analízis	20
3.1.8. Sejtciklus vizsgálata egy-paraméteres áramlási citometriával	21
3.1.9. Pulse-chase jelölés és két-paraméteres áramlási citométer vizsgálata	21
4. EREDMÉNYEK	23
4.1. Az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ emelkedés hatása TF-1 sejtek életképességére és osztódására	23
4.1.1. Különböző kezelések csoportosítása az $[Ca^{2+}]$ emelkedés és az általa kiváltott biológiai hatás alapján	23
4.1.2. A kiváltott intracelluláris $[Ca^{2+}]$ változás jellemzése	24
4.1.3. Receptor közvetített és Ca^{2+} emelő szerek által kiváltott intracelluláris Ca^{2+} szint változások TF-1 sejtekben	25
4.1.4. A Ca^{2+} jelek hosszú távú hatásának vizsgálata a sejtek életképességére és osztódására	26
4.1.5. A $[Ca^{2+}]$ emelkedés hatása a Bcl-2 fehérje család expressziójára	29
4.2. Az ERK1/2- MAPK szerepe a növekedésben és túlélésben	31
4.2.1. A MEK gátlásának hatása a hormon-független túlélésre	31
4.2.2. Az ERK1/2 és az Elk-1 aktivációjának jellemzése	32
4.2.3. A c-Fos transzkripció faktor kifejeződése és expressziójának gátlása	34
4.3. Ca^{2+} aktivált neutrális proteáz szerepe a sejtosztódásban	36
4.3.1. Kalpain gátlás hatása a TF-1 sejtek életképességére és osztódására	36
4.3.2. A sejtciklus változás nyomon követése egy-paraméteres áramlási citométerrel	38
4.3.3. Kalpain specifikus gátlás hatása a sejtciklus egyes fázisaira	43
4.3.4. A két paraméteres pulse-chase jelölt minták eredményeinek kiértékelése	45
4.3.5. A kalpain gátlás hatása a sejtciklus fázisokon való áthaladás sebességére	48
4.3.1 A kalpain gátlás hatása az ERK1/2 MAPK útvonalra	50
5. MEGBESZÉLÉS	52

6. KÖVETKEZTETÉSEK	62
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	63
8. IRODALOMJEGYZÉK	64
9. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	73
10. ÖSSZEFOGLALÓ	74

RÖVIDÍTÉSEK

A23187	Ca ²⁺ ionofór
BrdU	Bróm-dezoxi-uridin, timidin analóg
[Ca ²⁺] _i	szabad citoplazmatikus kalcium koncentráció
CaM	kalmodulin
CPA	ciklopiánsav
Elk-1	Ets domén fehérje-1
Epo	eritropoietin
ER	endoplazmás retikulum
ERK1/2	<u>E</u> xtracellular signal- <u>R</u> egulated <u>K</u> inase
FACS	áramlási citométer
GM-CSF	Granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor
Kalpain	Ca ²⁺ aktivált neutrális proteáz.
MAPK	<u>M</u> itogen Activated Protein <u>K</u> inase
MEK	MAPK/ERK kináz
PD 98059	2'-amino-3-methoxiflavon (MEK-1 gátlószer)
PD150606	specifikus kalpain gátlószer
PARP	poli-ADP-ribóz polimeráz
PI3K	foszfátidil-inozitol-3-kináz
PI	propidium jodid
PMA	forbol-12-mirisztát-13-acetát
SERCA	szarko-endoplazmatikus retikulum Ca ²⁺ -ATPáz

BEVEZETÉS

Ma már távolinak tűnik Sidney Ringer úttörő munkája, amelyben kimutatta, hogy a patkányok szívműködésének összehúzódására jótékonyan hat a londoni víz magas kalcium tartalma [1]. Ez volt az első lépés azon a hosszú úton, amelynek során általánosan elfogadottá vált, hogy a kalcium létfontosságú a sejtek életében, a megtermékenyítés pillanatától a sejthalálig. Továbbra is a biológiai és orvostudományok egyik központi kérdése, hogy miért képes a kalcium ennyi folyamatot egyszerre szabályozni. Otto Loewy-t idézve „*Ja Kalzium, das ist alles!*” (Hát igen, a kalcium, az minden!). Másik témánkra, az osztódás, a túlélés és a sejtpusztulás ciklusának megismerésére legalább ekkora figyelem fordul. Ha rákeresünk a PubMed oldalain, osztódással és/vagy sejthalállal foglalkozó több mint 800 000 cikk közül válogathatunk, kalciumot körülbelül 400 ezren idéznek, leukémiával több mint 200 000 cikk foglalkozik. A kalcium aktivált neutrális proteázzal, a kalpainnal - kutatócsoportunk érdeklődésének központi tárgyával - ugyan egy „szűk” réteg foglalkozik csak, mégis közel 5 ezer cikk jelent meg, és ennek is a fele az elmúlt 10 évben. A nagy érdeklődés ellenére ismereteink a kalcium szerepéről, az osztódásról és az élet folyamatainak szabályozásáról, ezen belül a kalpainokról még továbbra is hiányosak.

Tanulmányom két kutatócsoport közös érdeklődési területének átfedéséből született. Munkám megkezdésekor a kutatócsoport már hosszú évek óta foglalkozott a kalpain *in vitro* szerkezet-hatás vizsgálatával, én a kalpain *in vivo* szerepének vizsgálatát kezdtem meg. Az irodalomban régóta ismert, hogy a kalpain a kalcium jelet dekódolja, hatására aktiválódik, és jelátvivőként, illetve modulátorként részt vesz a sejtekben lejátszódó folyamatok szabályozásában az osztódástól kezdve, a hosszú távú memória kialakulásán keresztül egészen a sejt pusztulásig. Korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy a szabad intracelluláris kalcium szint ($[Ca^{2+}]_i$) emelés hatására eritroid differenciáció játszódik le egér eritroid-leukémia sejtekben [2]. Szoros együttműködésben az Immunológiai Intézet Molekuláris Sejtbiológiai Osztályának, Szigáltranszdukciós csoportjával, munkámhoz egy olyan sejtvonalat választottam, amellyel a kalpain szerepe az érésben, osztódásban és sejtpusztulásban tanulmányozható.

Dolgozatomban a TF-1 sejteken végzett kísérleteink eredményét mutatom be. Ez a humán, hormon-függő, korai, mielo-eritroid sejtvonal modellül szolgálhat a csontvelői eritroid elősejtek jelpályáinak feltérképezéséhez. A vizsgálatok során a $[Ca^{2+}]_i$ -emelő szerek és a kalpain hatását vizsgáltam TF-1 sejteken. Fiziológiai körülmények között az eritroid

elősejtekből, érési stádiumtól függően, Epo illetve GM-CSF hormonok okozhatnak átmeneti $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést [3]. Az $[Ca^{2+}]_i$ emelkedése hormon-független túléléshez és osztódáshoz vezetett, de eritroid differenciációt nem indukált. Magasabb $[Ca^{2+}]_i$ növekedés apoptózist váltott ki. A kalpain gátlás a TF-1 sejtek érését, és túlélését nem befolyásolta, ugyanakkor a sejtosztódást mérsékelte. Mivel $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés eddig csak elektromosan ingerelhető sejteknél váltott ki túlélési folyamatokat, figyelmünket a jelenség háttérében álló folyamatok feltárására irányítottuk. A dolgozat első felében az ERK1/2 aktiválódását vizsgáltam $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés hatására, mert a növekedési jelek rendszerint az ERK1/2 mitogén aktivált protein kináz (MAPK) aktiválódását okozzák. Eredményeim azt mutatták, hogy az ERK1/2 MAP kináznak kulcsszerepe van a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés okozta hormon-független túlélésben. Ugyanakkor a kalpain nem befolyásolta az ERK1/2 MAP kináz pálya aktiválódását. A dolgozat második felében, arra kerestem választ, hogy a kalpain a sejtciklus melyik fázisában játszik szerepet. Eredményeim részletes ismertetése előtt rövid áttekintést nyújtok a kalcium jelátvitelről, szerepéről az osztódásban, az ERK1/2 MAPK pálya aktiválódási útvonaláról, a kalpain aktiválódásáról és szerepéről és végül összefoglalom a modellként használt TF-1 sejtvonalról meglévő ismereteket.

1 IRODADALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. Az intracelluláris kalcium szintek változtatása és annak hatása

Az intracelluláris Ca^{2+} szint változása nagyon sokféle és egymástól különböző folyamatot szabályoz a sejt működése során. Részt vesz az osztódás, érés, összehúzódás, valamint a kiválasztás folyamataiban, ugyanakkor a mértékében vagy időtartamában szabályozatlan Ca^{2+} -jel a sejt halálát okozza.

A sejtek rendkívül szoros szabályozás alatt tartják a szabad intracelluláris Ca^{2+} szintet, ami kulcsa a gyors, térben és időben elhatárolható, és ezáltal lefordítható/dekódolható jelátvitelnek. Nyugalmi állapotban, a sejtekben a szabad intracelluláris kalcium koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) értéke $\sim 100\text{nM}$. Ezt főleg az aktív Ca^{2+} transzporterek segítségével tartja fenn a sejt, amik a Ca^{2+} -ot részben a sejtszervecskébe pl. endoplazmás vagy szarkoplazmás retikulumba pumpálják (SERCA pumpák), részben az extracelluláris térbe ürítik (pl. PMCA). A sejtek különböző kompartmentjeiken belül is eltérő Ca^{2+} grádiens alakítanak ki. Az intracelluláris Ca^{2+} emelkedés, az intracelluláris raktárakból felszabaduló, vagy a plazmamembrán csatornákon keresztüli Ca^{2+} beáramlás eredménye [4, 5]. Az extracelluláris tér szabad Ca^{2+} koncentrációja mintegy 10 000-szer magasabb, 1-2mM körül van. Ingerület átvitelkor a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ meghaladhatja az $1\mu\text{M}$ -t. Különböző mintázatokban váltható ki Ca^{2+} jel. A legegyszerűbb esetben a csatornákon beáramló ionok a csatornák zárását követően gyorsan szétdiffundálnak, illetve a környezetben lévő Ca^{2+} -ion felvevő rendszereknek köszönhetően a jel hamar lecseng. Ezek az elemek alkotják a Ca^{2+} jelátvitel építőköveit. Tér és időbeni lefutásuk függ a csatornáktól, és a csatornák elhelyezkedésétől. A Ca^{2+} jelek a csatornák közvetlen közelében helyi hatást váltanak ki vagy több csatorna összehangolt jeladásán „ Ca^{2+} hullámokon” keresztül általánosabb, globális folyamatokat indítanak a sejt vagy akár a sejtek/szövet szintjén. A Ca^{2+} jel elengedhetetlen a sejt fenntartásához, működéshez, ugyanakkor a hosszan tartó Ca^{2+} szint emelkedés a sejt halálhoz vezet. Ezt megelőzendő, a sejtek alacsony amplitúdójú vagy rövid, átmeneti úgynevezett tranziens Ca^{2+} jeleket használnak. Egyszeri tranziens jelek helyi folyamatokat, pl. szekréciót indítanak. Más esetekben a sejtek többször ismétlődő Ca^{2+} oszcillációt használnak jeladásra. A Ca^{2+} oszcillációk időtartama információfüggően tág időintervallumban változik, kezdve az izom összehúzódásoknál általános 0,1-0,5 másodperctől, a sejtosztódás során tapasztalható 10-20 órán át tartó spontán tranziensekig. A Ca^{2+} jelek frekvenciája és amplitúdója is meghatározó.

A megnövekedett $[Ca^{2+}]_i$ jeleket a sejtekben lévő kalcium-kötő fehérjék módosítják és lefordítják a sejtet szabályozó folyamatokra. A kalcium-kötő fehérjék családját alkotják a különböző citoszolikus Ca^{2+} pufferek, például a kalretikulin, vagy a szabályozó fehérjék, mint a kalmodulin, és nem utolsósorban a Ca^{2+} jelet dekódoló és végrehajtóként is működő Ca^{2+} -függő-enzimek, mint a kalcium-kalmodulin függő kináz II, a kalcineurin vagy a kalpain. A kalpain a Ca^{2+} oszcillációk frekvenciájára érzékeny dekoderként működhet [6], míg a CAMKII inkább a jel amplitudóját és hosszát érzékeli [7].

A Ca^{2+} jelátvitel zavara növekedési problémákhoz, a sejtosztódás szabályozásának elégtelenségéhez és a rák kialakulásához vezethet. A Ca^{2+} szabályozás alatt álló jelpályák többnyire érintettek a daganatok kialakulásában. A Ca^{2+} szabályozás megváltoztatásával a tumorsejtek a sejtváándorlás befolyásolásán keresztül az invazivitást növelheti, ezenfelül angiogenezishez fontos jelpályákat indíthat el, transzkripciószabályozást módosítja, a sejtek differenciációját és osztódását irányíthatja, telomeráz aktivitására hathat, a DNS sérülés kiváltotta válasz mechanizmusok egyes részeire kihat, (pl poly(ADP-ribose)polymeráz-1 (PARP1) aktivitásának modulálásán keresztül a túlélés és apoptotikus mechanizmusaira), megakadályozhatja a túlzott mitokondriális Ca^{2+} felhalmozódást ezzel csökkentve a sejthalál kiváltásának lehetőségét.

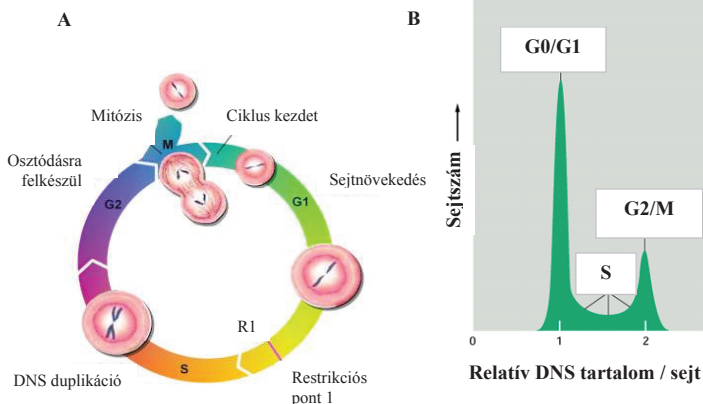
1.2. A sejtosztódás és túlélés szabályozása

1.2.1. Kalcium szerepe a sejtosztódás folyamatában, a sejtciklus fázisai és szabályozása

A sejtciklus szabályozása minden testi sejtben azonos mechanizmusokkal történik. A sejtciklust a szabályozó elemeinek aktiválása és inaktiválása kíséri, amely elsősorban a szabályozásban résztvevő fehérjék szintjeinek és aktivitásának ciklikus változásában nyilvánul meg. A sejtek osztódását növekedési jelek szabályozzák. Nyugalmi állapotban a sejtek a G0 fázisban várakoznak, ami a sejt állapotától, illetve környezetétől függően hosszabb vagy rövidebb ideig tart. A G0 fázisban lévő sejtek növekedési jelek (például GM-CSF) hatására jutnak el a G1 fázisra keresztül az S fázisba, ahol a DNS állomány megkettőződik. Az S fázist követő G2 fázisban előkészülnek az osztódásra és az M fázisban lejártszódik a mitózis. Az 1.A ábra szemlélteti a sejtciklus során végbemenő folyamatokat és a DNS tartalom változását, amit a DNS mennyiség alapján propidium jodidos festéssel követhetünk (lásd 1.B ábra). A sejt szoros szabályozás alatt tartja a DNS-szintézis megindulását, hogy csak azok a sejtek osztódjanak, amik esetében erre szükség van. A G1-S határán az indokolatlan sejtosztódást a legösszetettebb ellenőrzési pont felügyeli (restriction

point 1, R1), amin túl a sejteknek már nincs visszaút: befejezik az osztódást, vagy elpusztulnak. A sejt egy sor további ellenőrzési ponton keresztül figyeli, hogy a DNS-állomány megkétszereződése, a mag- és sejtosztódás végén két azonos, intakt, nem károsodott genommal rendelkező leánysejt jöjjön létre. A sejtciklus legfontosabb lépéseit folyamatosan ellenőrzés alatt tartja, pl. a teljes DNS állomány osztódott, nem történt-e DNS károsodás, magorsó összeállása teljes, kromoszómák felsorakozása és szétválása rendben zajlik-e. Amennyiben hibát észlel, a sejtosztódás folyamata leáll, a sejt un. „repair” (javító) mechanizmusain keresztül megpróbálja a hibát kijavítani, s amennyiben nem sikerül apoptózist, azaz programozott sejthalált indukál.

A sejtek osztódása során ismétlődő Ca^{2+} csúcsok jelennek meg, amelyek létrejöttéhez mind a belső raktárakból, mind a külső térből származó Ca^{2+} elengedhetetlen. Ezek a Ca^{2+} -jelek aktiválják azokat az azonnali válaszadó korai géneket, amelyek a nyugvó sejtek sejtciklusba való belépéséért felelősek (korai G1), elősegíthetik a DNS szintézis elindulását a G1-S átmenetben[8], és hozzájárulnak a sejtciklus befejezéséhez (mitózis). Mindhárom eseményt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változás kísér [9-11]. A Ca^{2+} jelek fontosságát szemlélteti, hogy ha az extracelluláris Ca^{2+} szintet 1mM-ról 0,1mM-ra csökkentjük, a sejtek abbahagyják az osztódást [12]. A Ca^{2+} jelek különösen a korai G1 fázis során az azonnali-korai gén termékek, mint a c-Fos, c-Jun és a c-Myc transzkripciósi faktorok expressziójához fontosak, amelyek elengethetetlenek a ciklin D1



1. ábra A sejtciklus sematikus ábrája (A) és a sejtciklus hányad meghatározás egy paraméteres vizsgálatával (B). Az 1.B ábra egy adott minta sejtszám eloszlását mutatja a sejtek DNS tartalmának függvényében. Az egyszeres DNS állománnyal rendelkező sejtek a G0/G1, a megduplázódott DNS tartalmúak a G2/M, a két érték között elhelyezkedő sejtek pedig az S fázisban vannak. Mivel az S fázis elején és a végén tartozkodó sejteket nem lehet elkülöníteni DNS tartalom alapján a G1 és G2 fázisoktól, ezért speciális illesztő program szükséges a kiértékeléshez. (Forrás: Molecular Biology of the Cell, 3. kiadás).

kifejeződéséhez. A Ca^{2+} közre játszik a ciklinD-CDK4 és a ciklinE-CDK2 komplexek helyes összeszerelésében és aktivációjában. Az S fázis megkezdéséhez a retinoblasztóma fehérjének (RB) a foszforilációjának szabályozásán keresztül van meghatározó szerepe [13]. A CDK komplexek aktiválása mellett, a Ca^{2+} fontos a centroszómák duplikációjának és kettéválásának szabályozásában [14, 15]. Ennek zavara helytelen mitotikus orsó kialakulásához, genetikai instabilitáshoz, aneuploid sejtekhez és a rák kialakulásához vezethet. A mitózisból történő kilépéshez az anafázisban szükség van Ca^{2+} -csúcsokra [16], Ca^{2+} injektálás vagy a Ca^{2+} -pumpák gátlásával az orsók felbomlanak és a sejt anafázisba lép [17].

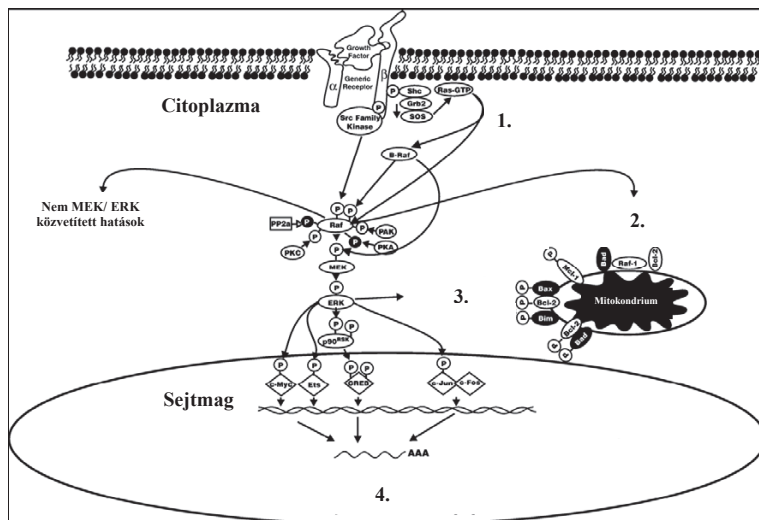
A Ca^{2+} helyenként direkt szabályozó funkciót lát el, de többnyire indirekt módon, például a kalmodulin (CaM) [18], kalcium-kalmodulin kináz II (CaMKII) [19], a kalcineurin [20] és mint a későbbiekben részletesebben kitérünk a kalpain aktiválásán keresztül fejti ki hatását.

1.2.2. A MAPK jelátviteli útvonalak

A MAP kináz útvonalak egymást követő szerin/treonin kinázokból állnak, amelyek képesek foszforilálni és ezáltal aktiválni az utánuk következő kinázt. A három legfontosabb MAP kináz útvonal az ERK, a p38 és a JNK út, amelyek az utolsóként aktiválódó kinázzal kapták a nevüket [21]. Ebben a munkában az ERK1/2 MAP kináz szerepét vizsgáltuk a hemopoetikus sejtek szaporodásában, túlélésében és a sejtpusztulásban. Az ERK MAP kináz út több módon is aktiválódhat, elsősorban növekedési faktor receptorokon keresztül, de különböző kémiai indukálószerke, vagy a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ megemelkedése is aktiválhatja. Az ERK1/2 aktiválódása a következő általános séma szerint zajlik: a növekedési faktor-, illetve citokin-receptorok ligandkötése után egy tirozin kináz aktiválódik, amely a receptor citoszolikus részén lévő tirozinok foszforilálásával kötőhelyeket biztosít különböző adapter molekulák számára. Az ilyen adapter molekulákhoz kötődnek olyan faktorok, amelyek elősegítik a Ras GTP kötött formájának kialakulását. A Ras-GTP közvetlenül kapcsolódik a Raf szerin/treonin kinázhoz, amely így kikötődik a plazmamembránhoz és aktiválódik [22]. Az aktív Raf foszforilálja a MEK kettős specificitású kinázt, a szerin 218 és szerin 222 aminosavakon, ami a MEK kináz

aktiválódásához vezet [23]. Ezután a MEK a treonin 183 és tirozin 185 aminosavakon foszforilálja és így aktiválja az ERK1 és ERK2 kinázokat [24].

A Raf/MEK/ERK út aktiválódása kulcsfontosságú a sejt osztódásában és túlélésében [25] (lásd 2. ábra). Ez az útvonal, több sejtciklust meghatározó fehérje expresszióját kezdeményezi, és/vagy aktivitását modulálja, beleértve a ciklin dependens kináz inhibitorokat (pl. $p16^{\text{Ink4a}}$, $p21^{\text{Cip1}}$), ciklineket (pl. ciklin D1), transzkripciós faktorokat (pl. c-Jun, c-Myc, c-Fos, CREB, p53) és anti-apoptótikus fehérjéket (pl. Bcl-2, Bcl-xl). A Raf/MEK/ERK kaskád számos pro-apoptótikus fehérjét is foszforilál, mint például a Bad, Bim, Mcl és kaszpáz-9 és ezzel gátolja a működését [22]. Az útvonal más jelátviteli pályával is kölcsönhat, egymás aktivitását kölcsönösen szabályozzák, az egyes jelpályák konvergálása általános. Az jelpálya kezdeti szakaszában lévő Raf fehérje overexpressziója különböző biológiai hatásokat eredményezhet, mint a sejtosztódást, sejt ciklus leállást vagy az apoptózist [26-28]. Jelentőségét mutatja, hogy mutációit gyakran megtalálják transzformált sejtvonalakban és humán rákos megbetegedésekben [22]. Az útvonal gátlószerei rákellenes gyógyszerfejlesztések kiindulópontjai.



2. ábra A Raf/MEK/ERK útvonal szerepét mutattja a sejtosztódásban és a túlélés szabályozásában. A nyitott rombuszok a kaskád által szabályozott transzkripciós faktorokat mutatja. A Raf/MEK/ERK pályát több kináz, pl. a Ras szabályozza (1.). A Raf kináz hat a mitokondriális fehérjékre (2.), az ERK pro- és anti-apoptótikus fehérjéket foszforilál (3.),

valamint befolyásolja a transzkripciót (4.). Az ábra Mc Cubrey összefoglaló cikkéből származik [22].

1.3. A kalpain aktiválódása, és szerepe a sejtek életében

A kalpainok, állati és növényi sejtekben általánosan előforduló Ca^{2+} -aktivált neutrális, cisztein-proteázok. A jelátviteli pályákon hatásukat célfehérjék limitált proteolízisével fejtik ki. A kovalensen módosított célfehérje továbbítja a jelet a reakciólánc disztális tagjai felé. Általános, illetve szövetspecifikus előfordulásuk révén számos élettani és kórtani folyamat feltételezett résztvevői. Az általánosan előforduló m- és μ -kalpainok egy nagy (80 kDa, katalitikus) és egy kis (30 kDa, regulátor) alegységből állnak. A humán m- ([NP 005177](#)) és μ -kalpain ([NP 001739](#)) nagy alegységei szekvencia illesztés alapján (Lalign program X. Huang and W. Miller (1991) Adv. Appl. Math. 12:373-381) 62,7%-ban azonosak. Elnevezésük az *in vitro* aktiválásukhoz szükséges mM és μM koncentrációjú Ca^{2+} -ion igényükből ered. A kalpain szupercsaládba sokféle, e két legtöbbet kutatott kalpaintól jelentősen eltérő szerkezetű és funkciójú fehérje is beletartozik, amelyek túl vagy alul aktivációja több betegség kialakulásában szerepet játszik. Jelen munkánkban azonban csak a két általánosan előforduló izo-forma szerepét vizsgáltam, ezért a kalpain kifejezés a tanulmány további részében e két izo-formára utal, hacsak külön nem jelezzük.

A kalpainok legalább egyik izo-formája és specifikus inhibitoruk a kalpasztatin minden gerinces sejtben megtalálható. A legtöbb sejtben és szövetben a kalpasztatin aktivitása meghaladja a kalpainokét [29]. A kalpainok és a kalpasztatin fiziológiás körülmények között intracellulárisan, általában kolokalizálva található. Nyugvó állapotban a kalpainok egyenletesen elosznak a citoplazmában, míg aktiváció, például ionomycin kezeléssel kiváltott Ca^{2+} ion beáramlás hatására, a kalpainok a plazmamembrán mentén feldúsulnak. Alap állapotban a kalpasztatin a sejtmag közelében aggregálódik [30]. A kalpain-kalpasztatin rendszer bonyolult, egyelőre még nem teljesen tisztázott szabályozás alatt áll. A jelenlegi elképzelések szerint, a szabályozásban az expressziós szint, lokalizáció/transzlokalizáció, kompartmentalizáció, a Ca^{2+} -szint emelkedés, a foszforiláltság és a szubsztrátok egyaránt befolyásoló tényezők [30-32]. A kalpainoknak több Ca^{2+} -kötő régiója van a kisalegységen és a nagy alegységen egyaránt [33-35], a Ca^{2+} -kötés konformáció változást indukál, amely elengedhetetlen feltétele az aktivációnak. A foszfolipid-kötő doménjein keresztül képes a membránokhoz kapcsolódni [33]. Feltételezhető, hogy a kalpain és aktiváló eleme(i) és szubsztrátjai komplexet alkothatnak. Elképzelhető, hogy különleges adapter „scaffolding” fehérjék segítik a szubsztrát és az enzim egymásra találását [36, 37]. A kalpain aktivitása

autolízissal nő [38], továbbá az aktív kalpain képes a kalpasztatin degradációjára. Érdekes módon, a kalpasztatin alacsonyabb Ca^{2+} koncentráció mellett, mint ami *in vitro* körülmények között a kalpain aktiválásához szükséges már asszociál a kalpainnal. A szintetikus úton előállított kalpasztatin A és C domén a sejtbé bejutatva képesek a kalpain Ca^{2+} igényét jelentősen csökkenteni [39, 40]. Elképzelhető, hogy a kalpasztatin lebontása során fiziológiásan is keletkezhetnek hasonló fragmensek.

1. Táblázat Reprezentatív kalpain szubsztrátok, azok szerepe, és a szabályozásuk hatása az egyes sejtfolyamatokra

Szubsztrát		Hatása	Funkció	Referencia
Bcl-2	Anti-apoptótikus fehérje	Inaktiváció	Apoptózis	[41]
Bax	Pro-apoptótikus fehérje	Pro-apoptótikus fragmens keletkezik	Apoptózis	[42]
Kaspázok (3, 7, 9, 12)	Apoptózisban szerepet játszó enzim	Aktiváció	Apoptózis	[43-45]
PMCA	Plazma membrán ATPáz	Növeli az aktivációt	Ca^{2+} szint emelkedik, jelátvitel	[46]
c-Jun	Transzkripciós faktor	Inaktiváció	Gén expresszió szabályozás	[47]
c-Fos	Transzkripciós faktor	Inaktiváció	Gén expresszió szabályozás	[47]
p53	Tumor szupresszor	Inaktiváció	Sejtciklus, apoptózis	[48]
Ciklin D1	G1 fázis-ciklin	Inaktiváció	Sejt ciklus	[49]
p21	CDK inhibitor	Inaktiváció	Sejt ciklus	[48, 50]
p27Kip1	CDK inhibitor	Inaktiváció	Sejt ciklus	[51]
p107	Tumor szupresszor	Inaktiváció	Sejt ciklus	[52]
Spectrin	Szerkezeti fehérje	Proteolízis	Sejtvándorlás	[53]
Talin	Szerkezeti fehérje	Proteolízis	Sejtvándorlás	[54]
PKC	Kináz	Aktiválás	Jelátvitel	[55]
Kalcineurin	Foszfatáz	Konstitutívan aktív, Ca^{2+} független	Jelátvitel	[11]
Protein-tirozin-foszfatáz 1	Foszfatáz	Inaktiváció	Jelátvitel	[56]

A kalpainok aktiválódása mellett, a másik megoldatlan kérdés a szubsztrátjaik felismerése. A kalpainok szubsztrátjaikat nehezen meghatározható szabályok alapján ismerik fel, választásukat a hasítási hely környékén lévő 10 aminosav bizonyos mértékben befolyásolja [57]. Többen megfigyelték, hogy *in vivo* a kalpain nem minden esetben hasítja a potenciális szubsztrátjait, még akkor sem ha aktív [29]. A legújabb kutatások eredményeként, úgy tűnik, hogy a szubsztrát környezete is befolyásolja a hasítás létrejöttét [58]. Mint a 1. Táblázat is mutatja, a kalpainok nagyszámú szubsztrát funkcióját modulálják, és ezáltal a kalciumhoz hasonlóan, illetve, mint a Ca^{2+} -jelet dekódoló fehérjék szerepet játszanak a sejt életének összes folyamatában [29]. Az 1. táblázat néhány fontos kalpain szubsztrátot mutat be.

A kalpain feltételezett sejtciklus szabályozó szerepéről már több közlemény is született. Főleg a G1-S átmenet ellenőrzési pontban, és a mitózis során vizsgálták hatását. A korábbi tanulmányok különböző sejteket, körülményeket és különböző szelektivitású gátlószereket alkalmaztak, ami hozzájárult az eltérő és néhol ellentmondásos eredményekhez. Néhány példát említve: a katepszinre is ható, E6d az oszteoblasztok [59] és fibroblasztok [60] proliferációját gátolja; a protein tirozin foszfatázra is ható calpeptin mellrák és simaizom sejtek osztódását akadályozta [55, 61, 62], míg más körülmények között nem befolyásolta [63]; a proteaszómát is gátló, Calpain Inhibitor I szintén vaszkuláris simaizom sejtek, fibroblasztok proliferációját akadályozta [64]. A ZLLY-CHN₂ kalpain gátlószerelel szelektált - μ -kalpain alacsonyabb szinten kifejező - sejtek lassabban osztódtak, μ -kalpain transzfektlálásával az osztódás sebessége helyreállt. Az esetek többségében a sejtciklusnak csak egy meghatározott részét elemezték. Hiányzott egy átfogó vizsgálat, amelyben a sejtciklus teljes hosszát, egyazon körülmények között, egy adott modell rendszerben elemeznék. Mi munkánkban arra törekedtünk, hogy az egész sejtciklust egységesen kezeljük, s tisztázzuk azokat az ellentmondásokat, amik korábban keletkeztek.

1.4 A TF-1 sejtvonala jellemzése

Vizsgálatainkhoz egy olyan sejtvonala (TF-1) használtunk, amelyet egy eritroid leukémiás beteg csontvelői sejtjeiből stabilizáltak. A TF-1 sejtek növekedéséhez GM-CSF vagy IL-3 szükséges, a hormon-megvonás a sejtek halálát okozza [65]. Ezek a korai, mielo-eritroid sejtek CD34 pozitívak és kémiai indukáló-szerekkel több irányba is differenciálthatóak (eritroid, makrofág [65] és megakariocita [66]). A sejtvonala mind Epo, mind GM-CSF receptorral rendelkezik. Epo hatására hemoglobint termel, de Epo receptora (EpoR) nem teljes, ezért a sejtek túlélését és osztódását nem segíti elő [67]. A GM-CSF közvetítette jelek

nem okoznak differenciációt, viszont a sejtek növekedéséhez és túléléséhez elengedhetetlenek. A GM-CSF receptora, hasonlóan az EpoR-hoz, az I citokin-receptor családba tartozik, és megegyezik a humán sejtekben leírt GM-CSF receptorral [68, 69]. A következő jelpályák aktiválódását írták már le TF-1 sejtekben GM-CSF hatására: PLC/PKC [70], JAK/STAT [71], NF- κ B [72], MEK/ERK1/2/p90RSK-CREB [73]. Korábbi munkánkban mi is azt találtuk, hogy a GM-CSF aktiválja a STAT-5, a Raf/MEK/ERK útvonalat, a CREB és az Elk-1 transzkripció faktorokat és a *c-fos* és *egr-1* azonnali válaszadó korai gének átírását. A Raf/MEK/ERK kináz útvonalnak negatív szabályozó szerepe van az eritroid differenciáció során [67]. Az általunk jellemzett sejt Epo receptorának, az a része hiányzik ahonnan a túlélésért felelős STAT-5 pálya aktivációja elindul. Az irodalmi adatok szerint a GM-CSF receptorról és a teljes Epo receptorról induló jelek humán csontvelő eritroid progenitor sejtekben szabad intracelluláris Ca^{2+} emelkedést váltanak ki [3]. Humán eritroblaszt sejtek felszínén feszültség független Epo szenzitív Ca^{2+} csatornákat is azonosítottak [74].

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az intracelluláris Ca^{2+} szint változás számos folyamatot indíthat el, amelyek túléléshez, sejtosztódáshoz, differenciálódáshoz vagy akár sejthalálhoz is vezethetnek. Jelen dolgozatban egy korai mielo-erithroid hormonfüggő sejtvonalon vizsgáltam a különböző Ca^{2+} emelő szerek hatását. Érdeklődésem középpontjában a hormon független túlélés és az osztódáshoz vezető jelátviteli útvonalak, beleértve a kalcium aktiválta neutrális proteáz feltételezett központi szerepe állt. Célom egy olyan rendszer kialakítása volt, amelyben vizsgálható, hogy milyen jelpályák segítségével értelmezi a sejt a különböző Ca^{2+} -jeleket. Munkám során az alábbi kérdésekre kerestem választ:

- Milyen biológiai hatásokat tudunk kiváltani különböző intracelluláris Ca^{2+} emelő szerekkel egy mielo-eritroid sejtvonalon? Milyen mértékű és lefutású jelek szükségesek a biológiai hatás kiváltásához?
- Melyik jelátviteli pálya aktiválódik a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedés hatására?
- Miben tér el a különböző kezelésekkel kiváltott $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedés hatására létrejövő ERK/MAPK jelátviteli pálya aktiválódása?
- Milyen szerepet játszik a kalpain a TF-1 sejtek osztódásában és túlélésében?
- A sejtosztódás melyik fázisában feltételezhető m- vagy μ -kalpain aktiválódás?
- Befolyásolja-e a kalpain gátlása az ERK/MAPK $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedés által létrehozott aktiválását?

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1.1. A felhasznált anyagok forrásai

Vizsgálatainkhoz a következő anyagokat használtuk: GM-CSF (granulocita-makrofág-stimuláló faktor); MEK-1/2 gátlószer PD98059 (New England Biolabs); kalpain specifikus gátlószer PD150606 (Calbiochem); NGS (Dakopatt, Dánia); elsődleges ellenanyagok: anti-(c-Fos), anti-(ERK1), anti-(ERK2), anti-(Bcl-xl), anti-(Bax) nyúl poliklonális IgG és anti-(foszfo-ERK), anti-(foszfo-Elk-1), anti-(Bcl-2) egér monoklonális IgG (Santa Cruz Biotechnology), és anti-BrdU monoklonális ellenanyag (Becton Dickinson) illetve másodlagos ellenanyagként nyúl IgG HRP konjugált és egér IgG HRP konjugált FITC-konjugált, kecske F(ab')₂ fragmens elleni egér IgG antitest (Jackson, West Grove, PA); ECL (Amersham). A PD 150606-ot a következő módon használtuk fel. Jellemzően 5 mg PD 150606-ot 500 µl jégén tartott metanolban oldottuk, 10 µl-ként szétosztottuk, majd vákuum alatt beszárítottuk és -20 °C tároltuk. Az egyes adagokat közvetlenül a kezelések előtt DMSO-ban oldottuk fel úgy, hogy a DMSO mennyisége ne haladja meg az 1nM-t a médiumban. Ionomycin és A23187 ionofórok, ciklopiánsav (CPA), tapszigargin SERCA-pumpa-gátlók, PKC aktiválószer PMA (forbol-12-mirisztát-13-acetát) és minden más vegyszer, ahol nincs külön jelezve Sigma.

3.1.2. A sejtvonal jellemzése, a sejtkultúra fenntartása és a kezelések körülményei

A TF-1 [65] hormon-függő, humán mielo-eritroid leukémia sejtvonalat Dr. C. Braun (Heinrich Pette Institute for Experimental Virology and Immunology Hamburg, F.R.G.) bocsátotta rendelkezésünkre. Sejtvonalunkat sejtfelszíni markerek meghatározásával jellemeztük, anti- CD34, CD38, CD33, CD14, CD15, és GPA monoklonális ellenanyagokkal (Immunotech, Marseille), FACS segítségével. A TF-1 sejtvonalat 2,5 ng/ml hrGM-CSF jelenlétében nukleozid mentes RPMI médiumban növesztettük, amelyet 10% FCS-sel, 50µg/ml streptomycinnel, 50 U/ml penicillinnel és 2 nM glutaminnal egészítettünk ki. A sejteket 5% CO₂ és 100% páratartalom mellett 37°C-os termosztátban tartottuk. Minden kísérlet előtt, kivéve, ahol külön jelezzük, 16 órás GM-CSF megvonással szinkronizáltuk a sejteket és ezután kezeltük a következő anyagokkal: GM-CSF, ionomycin, CPA és PMA. A külső Ca²⁺ megkötésére EGTA-t. A MEK1 kináz és a kalpain szelektív gátlószereit (PD98059 és PD150606) használtuk az ERK1/2 út vonal vizsgálatánál. Minden ettől eltérő körülményt valamint a használt anyagok koncentrációit feltüntettük az ábra aláírásokban.

3.1.3. Az intracelluláris szabad $[Ca^{2+}]$ meghatározása

A sejteket ($0,5 \cdot 10^6$ sejt/ml) 30 percig töltöttük $1,5 \mu M$ fura-2AM fluoreszcens festékkel $37^\circ C$ -on 1% FCS tartalmú friss médiumban. Ezután az extracelluláris fura-2AM festéket centrifugálással eltávolítottuk és a sejteket 1% FCS tartalmú friss médiumban felfuszpendáltuk. Ezután az ábrákon feltüntetett anyagokkal különböző inkubációs ideig kezeltük a sejteket. A sejtek fluoreszcenciáját HPMT oldatban, $37^\circ C$ -on, enyhe keverés mellett mértük Hitachi F4000 fluoreszcens spektrofluoriméterrel [75]. Az intracelluláris szabad $[Ca^{2+}]$ meghatározása a Tsien által leírt módszerrel történt [76]. Az extracelluláris fura-2 fluoreszcenciáját EGTA ($0,5 \text{ mM}$) adással majd ezt követően $CaCl_2$ (1 mM) adásával ellenőriztük a kontroll sejtekben. Figyelembe vettük a kalibrációs eljárás során a külső fura-2 mennyiségét, annak ellenére, hogy eléggé alacsony volt a vizsgált időtartamban.

3.1.4. A sejtszám és életképesség meghatározása

Az élő és az élettelen sejtek számát és az élő sejtek összes sejthez való arányát tripánkéék kizárás alapján határoztuk meg sejtszámolással. Az élő sejtek százalékos arányát („viability”, azaz életképesség) MTT teszttel [77] illetve FACS-on propidium-jodidos módszerrel [77] is meghatároztuk néhány esetben.

3.1.5. Kaspáz-3 aktivitás mérése

Petriceszénként $3 \cdot 10^6$ hormon-megvonással szinkronizált sejtet kezeltük különböző anyagokkal. Az ábrákon feltüntetett időpontokban a sejteket centrifugáltuk, majd a fagyasztás-olvasztásos módszerrel lízáltuk a következő összetételű oldatban: 20 mM HEPES-NaOH ($pH 7,4$), 50 mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$, 10 mM β -merkaptó-etanol, $0,4 \%$ Nonidet P-40, 2 mM PMSF, $100 \mu M$ Na_3VO_4 , $10 \mu g/ml$ aprotinin, $10 \mu g/ml$ leupeptin és $10 \mu g/ml$ antipain. Az így kapott minták fehérje tartalmát Bradford (Sigma) reagenssel határoztuk meg. Mintánként $50 \mu g$ fehérjét használtunk a kaspáz-3 aktivitás méréseire. A minták végtérfogátát $100 \mu l$ -re állítottuk be egy 10 mM HEPES-KOH ($pH 7,5$), 10% szukróz, 1 mM DTT, $0,025 \%$ CHAPS tartalmú oldattal, amely $50 \mu M$ Ac-DEVD-AMC (acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metil-kumarin) szubsztrátot is tartalmazott. Az AMC felszabadulást fluorimetrián (360 nm gerjesztő és 460 nm emissziós hullámhosszon) mértük az idő függvényébe. [77] A felszabaduló AMC koncentrációját fluoreszcencia intenzitásból számítottuk kalibrációs görbe segítségével. A minták kaspáz-3 aktivitását a GM-CSF megvonással szinkronizált sejtek aktivitásához viszonyítottuk ($3,3 \pm 0,5 \mu M$ ACM három független kísérletből számolva).

3.1.6. DNS létra kimutatása

Az ábrán feltüntetett kezelések után 5×10^6 sejtből a teljes celluláris DNS-t a proteináz K-fenol:kloroform:izoamilalkoholos módszerrel nyertük ki, [78] majd 1,8%-os etidium-bromid tartalmú agaróz gélen megfuttattuk és lefényképeztük.

3.1.7. A sejtek lizálása és a fehérje preparátumok készítése, Western-blot analízis

A különböző fehérje frakciók készítése a lizáló oldatok hozzáadásáig azonos módon történt. A Petri-csészékből a kezeléstől számított megfelelő idő elteltével 15 ml-es Falcon csövekbe vittük át a mintánként 4×10^6 sejtet és 1000 g-n 5 percig centrifugáltuk. A médium leöntése után 1,4 ml PBS-mix oldatban (PBS, 5 mM EDTA, 5 mM NaF, 100 μ M Na_3VO_4) Eppendorf csövekbe vittük át a sejteket. Gyors centrifugálást követően a felülúszót gondosan eltávolítottuk.

Oldható fehérje frakció preparálása Western-blothoz

A fent leírt módon kapott üledéket, annak mennyiségétől függően 60-120 μ l lizáló oldattal felszuszpendáltuk, majd 10 percig jégen erősen rázattuk, amit 12 perc centrifugálás követett, 13000 rpm-en, 4°C-on. A felülúszót Eppendorf csövekbe vittük át és egyharmad térfogatnyi háromszoros töménységű mintafelvivő pufferben 5 percen át forraltuk, majd -20°C-on tároltuk felhasználásig.

A lizáló oldat összetétele : 250 mM NaCl, 50 mM HEPES-Na (pH 7,4), 1 mM EDTA-Na, 1mM EGTA-Na, 1,5 mM MgCl_2 , 0,1% Nonidet-P-40, proteáz inhibitorok: 10 μ g/ml apronitin, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml antipain, 10 μ g/ml pepstatin és foszfátáz inhibitorok: 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM benzamidin, 20 mM NaF, 1 mM PMSF és 40 mM β -glicerofoszfát.

A mintafelvivő puffer összetétele : 20% SDS, 10% glicerol, 0,1 M EDTA (pH 7,4) , 1 M Tris (pH 7,0), 1 M β -merkaptotanol, 1% brómfenol-kék, 0,1 M DTT

Western-blot analízis

Mintánként 50 μ g fehérjét SDS-PAGE módszerrel választottunk szét, majd PVDF membránra vittük át Mini-Protein II készülék (Bio-Rad) segítségével. A következő ellenanyagokat használtuk az immunfestéshez: (i) elsődleges ellenanyagként, anti-(c-Fos), anti-(ERK1), anti-(ERK2), anti-(Bcl-xl), anti-(Bax) nyúl poliklonális IgG és anti-(foszfo-ERK), anti-(foszfo-Elk-1), anti-(Bcl-2) egér monoklonális IgG (Santa Cruz Biotechnology). (ii) illetve nyúl IgG HRP konjugált és egér IgG HRP konjugált (Jackson) másodlagos ellenanyagként. A Western blotot ECL-el (enhanced chemi-luminescence) hívtuk elő. A membránokat először a monoklonális ellenanyagokkal festettük, majd az eredmények jobb összehasonlíthatósága

érdekében minden membránt immunfestettünk egy másik ellenanyaggal is, amelynek mennyisége a kezelések idejétől és módjától független. A mi rendszerünkben erre alkalmas volt az ERK1/2 fehérjék ellen termeltetett poliklonális ellenanyag. A fehérje felvitel kisebb egyenetlenségeit az ERK1/2 festés alapján korrigáltuk. A Western blotok félkvantitatív értékeléséhez a RTG-filmeket Hewlett Packard 5100C scanner segítségével digitalizáltuk, és Bioscan v1.0 software felhasználásával értékeltük.

3.1.8. Sejtciklus vizsgálata egy-paraméteres áramlási citometriával

A sejtciklus vizsgálatát propidium jodidos (PI) festéssel határoztuk meg. [79] A sejtciklus vizsgálatának ez a módszere azon alapul, hogy a propidium-jodid (PI) a DNS-hez kötődve fluoreszcenssé válik. Az így jelölt sejtmagok fluoreszcenciája arányos DNS tartalmukkal. A G0 és G1 fázisokban lévő magok DNS tartalma pontosan fele a G2 és M fázisban lévő magokénak. Az S fázisú magok DNS tartalma e két érték között van. Áramlási-citométerrel mérhető a sejtmagok fluoreszcenciája, és ebből számítható a sejtek G0/G1, S, illetve G2/M fázisok közötti megoszlása. Ennek megfelelően, 10^6 kezelt sejtet PBS-ben mostunk, 70% etanolban fixáltunk egy éjszakán át, mostuk PBS-ben, majd $100\mu\text{g/ml}$ RNáz és $10\mu\text{g/ml}$ PI tartalmú PBS-ben állni hagytuk 30 percig, 37°C -on. A sejtek DNS tartalmát FACS Calibur (Beckton Dickinson) áramlási citométerrel határoztuk meg. Az adatokat ModFit program segítségével értékeltük.

3.1.9. Pulse-chase jelölés és két-paraméteres áramlási citométer vizsgálat

A sejtciklus egyes fázisainak hosszát kettős jelölt mintákkal áramlási citométerrel határoztuk meg. Ez a kettős jelölésen alapuló módszer a sejtenyészetben S fázisban lévő sejtek jelölését, majd egy későbbi időpontban meghatározhatjuk, hogy a megjelölt sejtek a sejtciklus melyik fázisában vannak. Az áramlási citométerrel egyszerre két fluoreszcens szignál detektálására volt lehetőség, amellyel az egyes sejtekben meghatároztuk az S fázisra utaló BrdU beépülést és DNS tartalommal arányos propidium jodid mennyiséget. Tenyészetben tartott, nem szinkronizált sejtek médiumához $30\mu\text{g/ml}$ Bróm-dezoxi-uridint (BrdU) adtunk; 20 perc inkubálás követően a médiumot lemostuk, és a sejteket friss, GM-CSF-t tartalmazó médiumba helyeztük, majd $80\mu\text{M}$ PD150606 hozzáadásával, vagy anélkül tovább tenyésztettük. A gátlószer hozzáadásától számítva ($t=0$) 3 óránként, 3 párhuzamos mintát vettünk és a korábban leírt módon fixáltuk azokat. Mintánként 2×10^6 sejtet használtunk. A fixált sejteket PBS-ben mostuk, majd felvettük 3 N HCl-ban és 30 percig inkubáltuk. A savas kicsapást 0,1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ($\text{pH}=8,5$) állítottuk le, majd 0,5% Tween 20-al, 1% NGS-el, $20\mu\text{l}$ anti-BrdU

ellenanyag, 180µl PBS-ben felfuszpendáltuk a sejteket és 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően PBS-ben mostuk, és további 1 órát inkubáltuk FITC-konjugált F(ab')₂ kecske anti-egér IgG fragmens oldattal (1:50 PBS; 0,5% Tween 20; 1%NGS). A másodlagos ellenanyaggal való inkubálás után a mintát lefugáltuk, és a sejteket 2µg/ml propidium jódid és 100µg/ml RNáz tartalmú PBS-ben éjszakán át hagytuk. Másnap áramlási citométerrel 488nm gerjesztési hullámhosszon és 515-545 nm (FITC) és 600-660 nm (PI) emissziós hullámhossz tartományokban határoztuk meg a sejtekbe beépült BrdU mennyiséget és DNS tartalmukat.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ emelkedés hatása TF-1 sejtek életképességére és osztódására

Tanulmányunk első felében arra kerestünk választ, hogy a humán hormon-függő mieloeritroid sejtvonalon a különböző kinetikájú intracelluláris Ca^{2+} szint változások milyen biológiai hatásokat váltanak ki. Célunk az volt, hogy egy olyan összetett modellt dolgozzunk ki, amin az eltérő Ca^{2+} jelek által kiváltott biológiai hatásokat lehet elemezni és összehasonlítani.

4.1.1. Különböző kezelések csoportosítása az $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés és az általa kiváltott biológiai hatás alapján

A TF-1 sejtvonal hormon-függő, ami azt jelenti, hogy a hormonmegvonás hatására a sejtek osztódása megáll, majd apoptotizálni kezdenek. Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció hatását a sejtekre ezért úgy vizsgáltuk, hogy a TF-1 sejteket 16 órán át GM-CSF mentes médiumban tartottuk (kiindulási időpont), hogy a növekedési jelek lecsengjenek, majd különböző $[Ca^{2+}]_i$ -emelő szerekkel (ionofórok és SERCA pumpa-gátlók) kezeltük és vizsgáltuk a kezelések biológiai hatásait (2. Táblázat). Eredményeink azt mutatták, hogy a biológiai hatások és a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés nagysága között összefüggés van. A különböző kezeléseket a Ca^{2+} emelkedés mértéke és biológiai hatása alapján 4 csoportba soroltuk. Alacsony 10-100 nM intracelluláris Ca^{2+} növekedés nem gyorsította jelentős mértékben a sejtek pusztulását, 150-200 nM emelkedés már hormon-független túléléshez, ~ 1000 nM túléléshez és sejtosztódáshoz, míg az ennél magasabb Ca^{2+} szint emelkedés gyors, nagymértékű sejtpusztuláshoz vezetett. A fizioiógias válasz csak a Ca^{2+} szint változásától függött, és független volt a kiváltás módjától (külső vagy belső Ca^{2+} forrásoktól). TF-1 sejtekben az intracelluláris Ca^{2+} szint emeléssel nem lehetett differenciációt kiváltani.

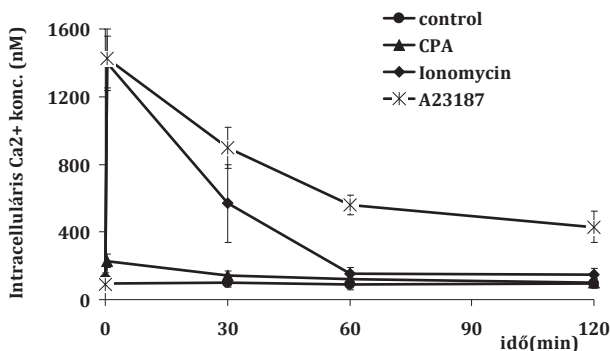
2. Táblázat A különböző $[Ca^{2+}]_i$ -emelő szerek hatására létrejövő $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés és biológiai hatásai.

$[Ca^{2+}]_i$ -emelő szer	$[Ca^{2+}]_i$ emelkedés	Sejtválasz
5 nM A23187 5-50 nM ionomycin	10-100 nM	Nincs, hormon megvonás okozta sejthalál
100 nM A23187 250 nM ionomycin 7,5 μ M CPA 50 nM TG	150-200 nM	Hormon-független túlélés
1 μ M ionomycin	~1000 nM	Hormon-független osztódás és túlélés
>1 μ M A23187 >2 μ M ionomycin	>1000 nM	Fokozott sejtpusztulás

4.1.2. A kiváltott intracelluláris $[Ca^{2+}]$ változás jellemzése

A különböző fiziológiás válaszok és az előidézett Ca^{2+} jel összefüggéseinek kinetikai vizsgálatához továbbiakban az alábbi kezeléseket választottuk ki: a 7,5 μ M CPA a hormon független túlélés, az 1 μ M ionomycint a hormon független túlélés és osztódás és az 1 μ M A23187 a gyors sejtpusztulás vizsgálatára. Ezek hatását kezeletlen (kontroll), GM-CSF hormon kezelt illetve a gyors sejtpusztulást modellező, de Ca^{2+} jelet nem kiváltó PMA-val kezelt sejtekhez hasonlítottuk. Megvizsgáltuk, hogy a különböző szintetikus $[Ca^{2+}]_i$ emelő szerekkel kiváltott eltérő biológiai hatások hátterében milyen Ca^{2+} szint változások állnak (3. ábra). A TF-1 sejteket hormon megvonást követően kezeltük, majd 2 órán keresztül fura-2 fluoreszcens festék segítségével követtük a sejtek $[Ca^{2+}]_i$ változását. Az xx ábra szemlélteti a különböző kezelések eltérő nagyságú és lefutású Ca^{2+} jeleit. A kezelést követő 2 órán belül sem a kontroll (3. ábra), sem a GM-CSF kezelt, sem PMA kezelt sejtekben nem változott az $[Ca^{2+}]_i$. Az A23187 és az ionomycin kezelés hasonlóan magas, mintegy 14-szeres Ca^{2+} emelkedést váltott ki, ugyanakkor nagy eltérés volt a két Ca^{2+} jel időbeli lefutásában. Az ionomycin által keltett jel gyorsan lecsenget, 1 óra elteltével a kiindulási állapotnál alig 50%-al magasabb szint körül megállapodott, ezzel szemben az A23187 kezelés még 2 óra elteltével

is több, mint 5-szöröse a kiindulási értéknek. A CPA kezelés mérsékelte, és gyorsan lecsengő Ca^{2+} szint-emelkedést idézett elő. Összefoglalva, átmeneti, szabályozott Ca^{2+} emelkedés hormon-független túléléshez vezetett TF-1 sejtekben, míg a hosszantartó magas Ca^{2+} szint felgyorsította a sejtek pusztulását.



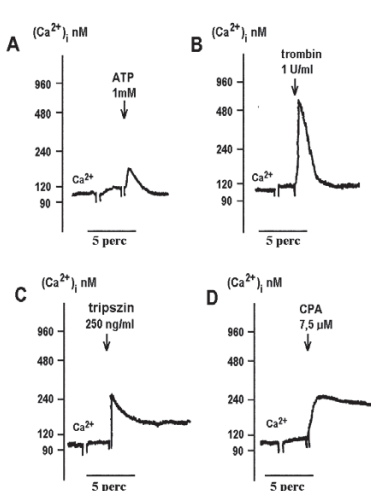
3. ábra Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változása az időfüggvényében különböző Ca^{2+} emelő szerek hatására

TF-1 sejteket, 16 órás GM-CSF megvonás után fura-2-AM festékkel feltöltöttünk (lásd Módszerek), majd külső $[\text{Ca}^{2+}]_o$ jelenlétében mértük az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ függő fluoreszcenciát. A sejteket az ábrán szereplő anyagokkal kezeltük, és a jelölt időpontokban mintát vettünk és meghatároztuk a fluoreszcencia mértékét. Az adatokat legalább 6 független kísérlet alapján számoltuk ki (átlag \pm szórás).

4.1.3. Receptor közvetített és Ca^{2+} emelő szerek által kiváltott intracelluláris Ca^{2+} szint változások TF-1 sejtekben

A Ca^{2+} szignál vizsgálatának kiinduló pontja annak meghatározása volt, hogy fiziológiásan előforduló szubsztrátok milyen Ca^{2+} jeleket váltanak ki TF-1 sejteken. Ennek érdekében, receptor közvetített Ca^{2+} jeleket hasonlítottunk össze szintetikus $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelő szerekkel kiváltott $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedéssel (4.A-D). Egy éjszakán keresztül hormon mentes médiumban tartott TF-1 (kontroll) sejteket Fura-2-AM festékkel feltöltöttük és az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ függő fluoreszcenciát mértük. A 4. ábra mutatja a kontroll sejtek $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változásait. A purinerg receptor ligand ATP (1mM) (4.A ábra) és a proteináz aktivált receptor (PAR) ligandok, a trombin (1U/ml) (4.B ábra) és a tripszin (250 ng/ml) (4.C ábra), mérhető $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedést okoztak. Ez a kezdeti $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedés az ATP és a trombin esetében pár percen belül eltűnt, míg a tripszin a SERCA pumpa gátlószerhez (CPA, 4.D ábra) hasonlóan hosszantartó

[Ca²⁺]_i emelkedést eredményezett. A többi vizsgált citokin receptor ligandok a GM-CSF, IL-3, IL-4, eritropoetin és NGF nem befolyásolták a TF-1 sejtekben a [Ca²⁺]_i-t. Összefoglalva, a CPA által kiváltott megemelkedett [Ca²⁺]_i fiziológiásan is előforduló tartományba esik.

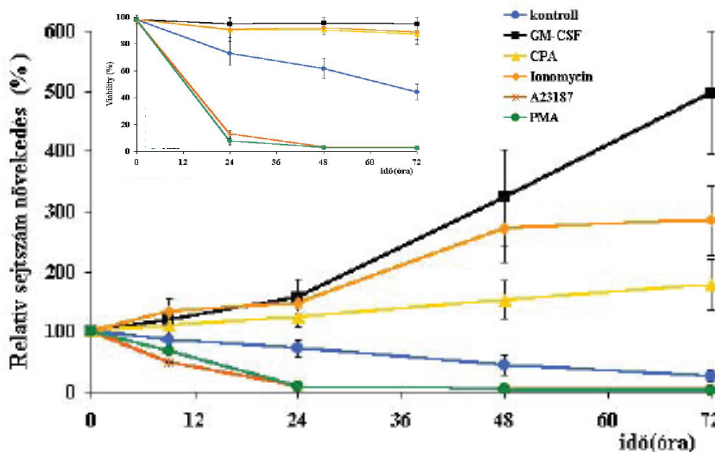


4. ábra Az [Ca²⁺]_i változása ATP (A), trombin (B), tripszin (C), illetve CPA (D) hatására. TF-1 sejteket, 16 órás GM-CSF megvonás után fura-2-AM festékkel feltöltöttünk (lásd Módszerek), majd külső [Ca²⁺]_i jelenlétében mértük az [Ca²⁺]_i függő fluoreszcenciát. A sejteket az ábrán szereplő anyagokkal kezeltük a nyílal jelölt időpontokban. Az ábra 3 független kísérlet jellegzetes eredményét mutatja.

4.1.4. A Ca²⁺ jelek hosszú távú hatásának vizsgálata a sejtek életképességére és osztódására

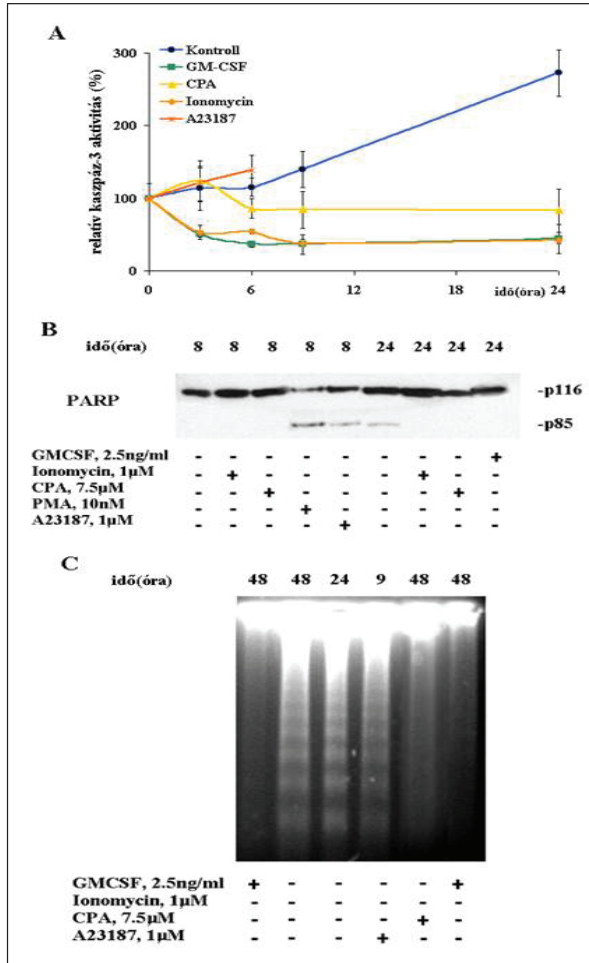
A különböző kezelések hosszú távú hatását a relatív sejtszámra és életképességre, a kezeléseket követő 72 órán keresztül vizsgáltuk Tripán-kék kizárásos módszerrel (5. ábra). Korábbi eredményeinkkel összhangban [67] a tartós hormon megvonás hatására a kontroll sejtek fokozatosan pusztultak, 48 óra elteltével számuk felére, míg 72 óra elteltével az eredeti érték negyedére csökkent. Az A23187 és a PMA kezelés a hormon megvonás negatív hatását fokozva, drasztikus sejtpusztulást eredményezett, 8 órán belül a sejtek fele elpusztult, egy nappal a kezelést követően már alig találtunk életképes sejtet. Ezzel szemben a CPA és az ionomycin kezelt sejtek száma a hormon hiány ellenére sem csökkent, életképességük a vizsgált időtartamban, a GM-CSF hormon pótoló sejtekéhez hasonlóan változatlan maradt. CPA mérsékelt sejtszám növekedést okozott, míg a ionomycin kezelt sejtek száma az első 48 órában közel megháromszorozódott, amit a sejtszám növekedés leállása követett. A kiindulási

időpontban GM-CSF-el kezelt sejtek kezdeti lassú fázist követően exponenciálisan növekedtek, 72 óra alatt számuk körülbelül 5-szörösére nőtt (5. ábra).



5. ábra A relatív sejtszám és életképesség változása különböző kezelések hatására. 16 óra hormon megvonás után a következő anyagokkal kezeltük a sejteket: 7,5µM CPA, 1 µM ionomicin, 1 µM A23187, 10 nM PMA és 2,5 ng/ml GM-CSF. A sejtszám és életképesség változásokat a feltüntetett időpontokban Tripánké-kizárásos módszerrel határoztuk meg. A sejtszám növekedést a kiindulási sejtszámról (100%) vonatkoztatva. Az életképesség az élő sejt/összes sejt arányát tükrözi. Az adatokat legalább 5 független kísérlet alapján számoltuk (átlag±szórás)

A hirtelen nagymértékű $[Ca^{2+}]_i$ növekedés általában izom- vagy idegsejtekre jellemző; nem ingerelhető sejtek nehezen viselik, bennük többnyire apoptotikus folyamatokat indít be. Ezért ellenőriztük, hogy a különböző kezeléseknél találunk-e apoptózisra utaló jeleket. Az apoptózisra jellemző markerek közül a kaspáz-3 aktivitást, a PARP hasítási terméket és a DNS fragmentumok megjelenését vizsgáltuk. A 6. ábrán jól látható, hogy a hosszan tartó hormon megvonás hatására a kaspáz-3 enzimaktivitás a megvonás idő függvényében nő, (6.A ábra), 24 óránál már megfigyelhető a PARP apoptózisra jellemző hasítási terméke (6.B ábra) és a DNS létra (6.C ábra). Az A23187 kezelt mintákban, a kontroll mintákhoz képest is gyorsabban nőtt a kaspáz-3 aktivitás, korábban detektálható a PARP hasítási terméke és a DNS feldarabolódása. A PMA kezelt mintákban a PARP hasítási termék 8 óránál jól látható.



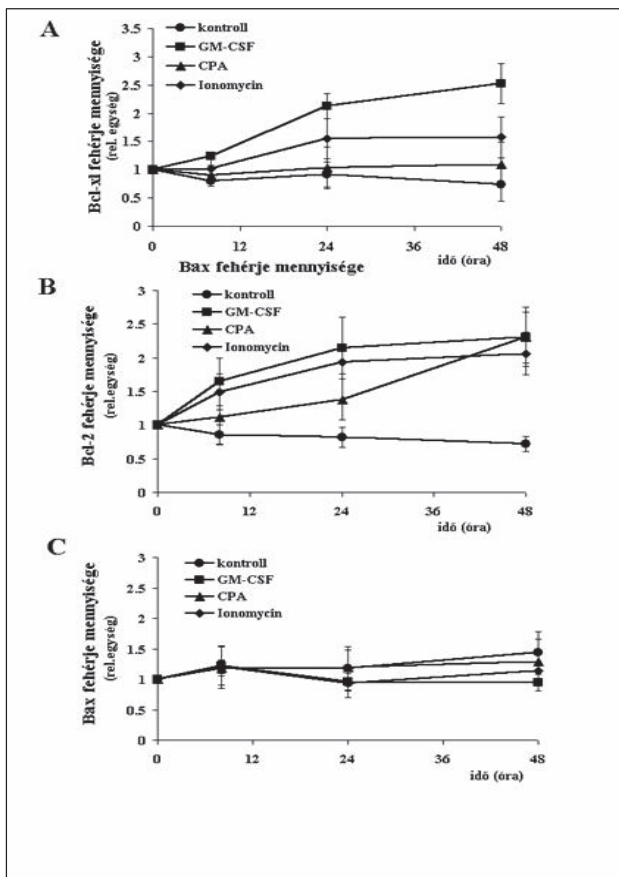
6. ábra A kaszpáz-3 aktivitás (A), PARP hasítási termék (B) és a DNS létra megjelenése (C) különbözően kezelt mintákban. A 16 órán át hormon megvonással szinkronizált mintákat az ábrán feltüntetett módon kezeltük, majd a jelölt időpontokban feltártuk. A kaszpáz-3 enzim aktivitást fluorimetriásan határoztuk meg (Lásd 3.1.5). Az ábrán három független kísérlet szinkronizált sejtekben mért értékeire vonatkoztattuk. A PARP hasítási termék megjelenését (B) Western blot analízissel vizsgáltuk a 3.1.6 leírtak szerint. 5×10^6 Sejtet kezeltünk a megadott anyagokkal, majd az ábrán feltüntetett időpontokban kinyertük a DNS-t a mintákból. Az agaróz gélen megfutatott mintákat lefényképeztük és itt bemutatjuk (C).

Ugyanakkor, CPA, ionomycin, illetve GM-CSF-el kezelt sejtek esetén az apoptotikus folyamatok háttérbe szorultak, a kaszpáz-3 aktivitás lecsökkent, és más apoptózisra utaló tényezőt sem figyelhető meg (6.A-C ábrák). A kaszpáz-3 aktivitás mind ionomycin, mind GM-CSF kezelés esetén a folyamatosan tenyészetben lévő kaszpáz-3 aktivitás szintjére esett vissza. Összhangban az életképesség meghatározás eredményeivel azt mondhatjuk, hogy kontroll, PMA és A23187 kezelt sejtek apoptózissal elpusztultak, míg az ionomycin és a CPA anti-apoptotikus folyamatokat indítottak el.

Összefoglalva, az ionomycin és CPA hatására keletkezett kontrolált Ca^{2+} növekedés megállította a hormon megvonás következtében beindult apoptotikus folyamatokat, és előbbi esetében még sejtosztódást is kiváltott. A megfigyeléseinkből arra lehet következtetni, hogy mind a Ca^{2+} növekedés, mind a GM-CSF képes túléléshez és osztódáshoz vezető jelátviteli útvonalakat aktiválni.

4.1.5. A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedés hatása a Bcl-2 fehérje család expressziójára

A Bcl-2 család pro- és antiapoptotikus fehérjéinek expressziós változása az egyik legismertebb mechanizmus, amely közrejátszik a sejtek túlélésében, s az apoptózishoz vezető folyamatok megelőzésében vagy kiváltásában. Teljes sejtől izolált fehérje mintákban Western-blot analízissel vizsgáltuk a fehérjecsalád anti-apoptotikus (Bcl-2, Bcl-xl) és pro-apoptotikus (Bax) tagjainak mennyiségét (7. ábra). A 16 órás hormon megvonást követő ($t=0$) időszakban 2 napon keresztül követtük a fehérje mennyiség változását. A Bcl-xl mennyisége GM-CSF visszaadása esetén, 24 órán belül megduplázódott, 48 órára 2,5-szeresére nőtt; ionomycin kezelés hatására 24 órára 1,5-szeresére nőtt, majd ezen a szinten maradt; CPA kezelés nem befolyásolta jelentősen (7.A ábra). A Bcl-2 szintje a GM-CSF, ionomycin és a CPA hatására egyaránt kétszeresére nőtt a vizsgált időszokban (7.B ábra). A CPA esetében a fehérje mennyiség lassabban emelkedett. Kontroll sejtekben mindkét anti-apoptotikus fehérje mennyisége lassan csökkent, míg a pro-apoptotikus Bax fehérje kis mértékben emelkedett. A Bax fehérje expresszióját szignifikánsan nem befolyásolták a kezelések (7.C ábra). Elmondhatjuk, hogy a TF-1 sejtek túlélésében az anti-apoptotikus Bcl-2 fehérjék túlsúlyos fontos szerepet játszhat.



7. ábra A Bcl-x1 (A) és a Bcl-2 (B) anti-apoptotikus, illetve a Bax (C) pro-apoptotikus fehérje mennyiségének változása hormon-megvont kontroll (●), valamint GM-CSF (■), CPA (▲) és ionomicin kezelés hatására (◆). 16 órás hormon megvonás után kezeltük a sejteket a feltüntetett anyagokkal. Az ábrán jelölt időpontokban mintát vettünk és az Anyagok és Módszerekben leírt módon a mintákat immunfestés után előhívtuk és kiértékeltek. Az így kapott értékeket a kezelés előtti fehérje szintekre normalizáltuk. A fehérje felvitel egyenletlenségeit az ERK mennyiségére korrigáltuk. Az ábrázolt adatok három független kísérlet eredményeinek átlagát és szórását mutatja.

Összefoglalva, azt tapasztaltuk, hogy a TF-1 sejtekben a hormon megvonás apoptotikus folyamatokat indít el, a sejtek életképessége fokozatosan csökken, ami jól korrelált a kaszpáz-3 enzim aktivitás növekedésével, a PARP hasítási termék megjelenésével, illetve a DNS létrával. A hormon-független túlélést kiválthatjuk átmeneti, szabályozott Ca^{2+} jellel. A jel mértékével arányosan az anti-apoptikus fehérjék expressziója megnő, a kaszpáz-3 aktivitása lecsökken és nem aktiválódnak más apoptózishoz vezető folyamatok se. Magasabb, átmeneti Ca^{2+} -szint emelkedés a túlélés mellett, osztódási folyamatokat is indukál. Ugyanakkor, tartósan magas Ca^{2+} -szint emelkedés, felgyorsítja az apoptotikus folyamatokat.

4.2. Az ERK1/2- MAPK szerepe a növekedésben és túlélésben

A következő részben arra kerestünk választ, hogy TF-1 sejtek esetén a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelő szerekkel kiváltott hormon-független túlélésért, osztódásért mely jelátviteli pálya aktivációja játszhat szerepet. További kérdésünk az volt, hogy a hosszan tartó $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedés okozta sejtpusztulás, hogyan befolyásolja ugyan ezt a jelátviteli pályát.

4.2.1. A MEK gátlásának hatása a hormon-független túlélésre

A sejtek túlélésében és/vagy osztódásában az egyik leggyakrabban szerepet játszó kulcsfontosságú jelátviteli pálya az ERK1/2-MAPK útvonal. E mellett excitotoxikus, túl aktiváló jelek hatására, apoptózisban is szerepet játszhat. Korábbi tanulmányaink során feltérképeztük, hogy a GM-CSF által kiváltott osztódásban aktivációja nélkülözhetetlen [67], ezért a MEK-1 specifikus gátlószerezrel (PD98059) megvizsgáltuk az útvonal érintettségét. A 4.1. fejezetben leírtakhoz hasonlóan 16 óra hormon megvonás után vizsgáltuk a PD98059 hatását GM-CSF illetve $[\text{Ca}^{2+}]_i$ szerekkel kezelt sejtek Bcl-2 expressziójára, sejtszám változására és életképességére. PD98059 gátolta a Bcl-2 fehérje expresszió (3. táblázat), továbbá - a GM-CSF kezelt sejtek kivételével- jelenlétében a sejtek életképessége és száma drasztikusan csökkent. A sejtpusztulás kontroll sejtekben volt a legnagyobb méretékű. Az a megfigyelés, hogy a CPA és PD98059 kezelés után az életképesség még mindig 53% volt, szemben a kontroll és PD98059 kezelés után mért $8,3 \pm 2,8\%$ -os értékkel, arra enged következtetni, hogy a MEK1 pályán kívül, másik jelátviteli út is aktiválódhatott. Érdekes módon a gátlószer ionomycinnel kezelt sejtekre toxikusabb, mint CPA-val kezelt sejtek esetében; feltehetően a magas $[\text{Ca}^{2+}]_i$ súlyosbította a kezelése okozta stresszt. Mindezekkel ellentétben, a GM-CSF-el kezelt sejtek életképességét nem befolyásolta a MEK-1 kináz gátlása, egyedül a sejtszám mértéke mérséklődött, a sejtszám 2 nap alatt a kiinduláshoz képest $322 \pm 79,3\%$

helyet $182,6 \pm 16,2\%$ nött. Ebből arra lehet következtetni, hogy GM-CSF kezelés több jelátviteli pályát aktivál, az ERK1/2-MAPK útvonal leginkább a sejtosztódást segíti elő, a hormon-függő túlélést más jelátviteli pályák közvetítik; míg az $[Ca^{2+}]_i$ emelő szerekekkel kiváltott hormon-független túléléshez az ERK1/2-MAPK útvonal aktivációja elengedhetetlen.

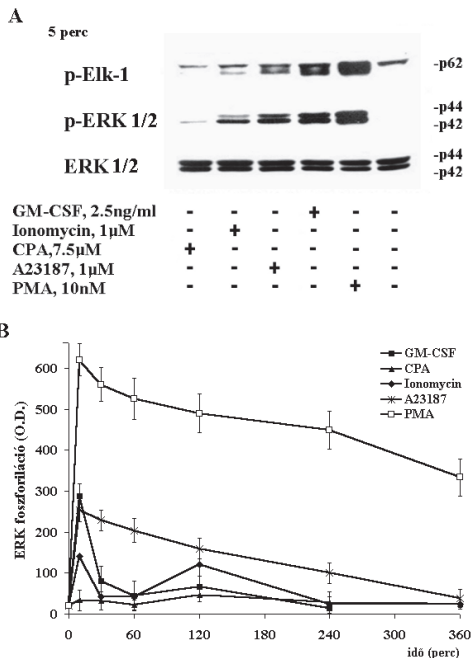
3. táblázat. A MEK-1 gátlószert, PD98059 hatása a sejt Bcl-2 szintjére, osztódására, és életképességére.

	Bcl-2 mennyiség (rel. egység)	Sejtszám növekedés (%)	Életképesség (%)
Kontroll	$0,91 \pm 0,12$	$44,8 \pm 16,1$	$61,6 \pm 7,4$
PD98059	$0,75 \pm 0,12$	$7,1 \pm 3,1$	$8,3 \pm 2,8$
GM-CSF	$1,47 \pm 0,19$	$322 \pm 79,3$	$95,5 \pm 3,9$
GM-CSF+PD	$0,85 \pm 0,13$	$182,6 \pm 16,2$	$92,0 \pm 4,1$
CPA	$1,28 \pm 0,16$	$153 \pm 32,1$	$90,0 \pm 3,2$
CPA+PD98059	$0,80 \pm 0,13$	$32,2 \pm 10,8$	$53,0 \pm 5,2$
Ionomycin	$1,39 \pm 0,20$	$271,0 \pm 55,4$	$95,0 \pm 3,4$
Ionomycin+PD98059	$0,78 \pm 0,15$	$15,2 \pm 5,5$	$14,0 \pm 4,8$

4.2.2. Az ERK1/2 és az Elk-1 aktivációjának jellemzése

A MEK1 kináz, a MAPK kaskád soron következő tagját, az ERK1 és az ERK-2 kinázt foszforilálja. Az ERK1/2 kináz aktivációjának mértékét és időbeli lefutását specifikus anti-pERK monoklonális ellenanyag segítségével követtük. 16 óra hormon megvonás hatására az ERK1/2 alapaktivitás lecsökkent, majd a kezelések által kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést az ERK1/2 gyors foszforilációja követte. Alacsony $[Ca^{2+}]_i$ mellett, kontroll sejtekben, az ERK1/2 kináz nincs foszforilálva, a CPA kezelés mérsékelt, $1\mu M$ ionomycin koncentráció fokozott, míg az A23187 jelentős mértékű foszforilációt eredményezett. A PMA kezelés nem okoz $[Ca^{2+}]_i$ növekedést, ugyanakkor a PKC aktiválásán keresztül az ERK1/2 erőteljesen foszforilálódik (8.A ábra). Az Erk1/2 foszforilációval aktiválhatja az Elk-1 transzkripciós faktort, ezért megvizsgáltuk az foszfo-Elk-1 mennyiségét a fent említett kezelések hatására. Az Elk-1 aktiváció jól korrelált az ERK1/2 foszforilációval (8.A és 8.B ábrák). A különböző

$[Ca^{2+}]_i$ emelő szerekkel kiváltott jel az $[Ca^{2+}]_i$ emelkedéssel arányos ERK1/2 és Elk-1 aktivációt indukált.



és szórását mutattja.

8. ábra Az ERK1/2 és Elk-1 fehérjék foszforilációja (A) és az ERK1/2 aktivációjának időfüggése (B) különböző kezelések hatására. 16 órás hormon megvonás után kezeltük a sejteket a feltüntetett anyagokkal. A kezeléseket 5 perccel mintát vettünk és Western blot analízissel meghatároztuk a pElk-1 és pERK1/2 mennyiséget (lásd Anyagok és Módszerek). Az ábra egy jellegzetes immunfestési képet mutat, pElk-1, pERK1/2 és ERK1/2 elleni ellenanyaggal festve (A). Az ábrán jelölt kezeléseket kiváltotta Elk-1 és ERK1/2 foszforilációjának időfüggését hasonlóan végeztük (B). Az így kapott értékeket a kezelés előtti fehérje szintekre normalizáltuk. A fehérje felvitel egyenletlenségeit az ERK mennyiségére korrigáltuk. Az ábrázolt adatok három független kísérlet eredményeinek átlagát

A megfelelő fiziológiás válasz kiváltásához, a MAPK útvonal aktiválódásakor az aktiváció szintje mellett annak időbeli lefutása is fontos szabályozó tényező. Ezért az első 6 órában követtük az aktiváció kinetikáját. Mind a GM-CSF, mind az ionomycin és a CPA kezelés kétfázisú ERK1/2 aktivációt váltott ki (8.B ábra). Az első csúcs mintegy 5 perccel a kezelés után jelentkezett, míg a másodikat 2 és 3 óra között érték el. A 5 perc után a CPA csak kis mértékben emelte az aktiváció szintjét, míg az ionomycin és a GM-CSF 13- és 28-szoros aktivációt váltott ki. Mindhárom esetben az ERK1/2 aktivációja 1 órán belül lecsengett. Érdekes módon a második csúcsonál az ionomycin jobban aktiválódott, mint a GM-CSF. A

CPA által kiváltott foszforilációs szint meghaladta az első csúcs értékét. Ugyan az A23187 és GM-CSF kezdetben, hasonló mértékben aktiválta az ERK1/2-t, az A23187 esetén ez az aktiváció fenntartott maradt, és csak lassan csökkent. A PMA nagyságrendekkel magasabb és fenntartott ERK1/2 foszforilációt idézet elő. Kontroll sejtekben a vizsgált időszakban az ERK1/2 nem foszforilálódott.

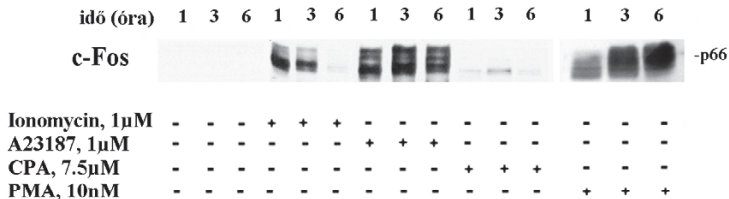
Összefoglalva, a Ca^{2+} emelő szerek által kiváltott foszforiláció mértéke, és időbeli lefutása korrelál az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásával. A GM-CSF, ionomycin és CPA által kiváltott ERK1/2 aktiváció időbeli lefutása szabályozott, kétfázisú szemben az A23187 és PMA által kiváltott magas, hosszan tartó kináz aktivációval. A kétfázisú, szabályozott ERK1/2 aktiváció esetén a sejtek túléltek, míg a hosszan tartó, magas ERK1/2 aktiváció apoptózishoz vezetett.

4.2.3. A c-Fos transzkripció faktor kifejeződése és expressziójának gátlása

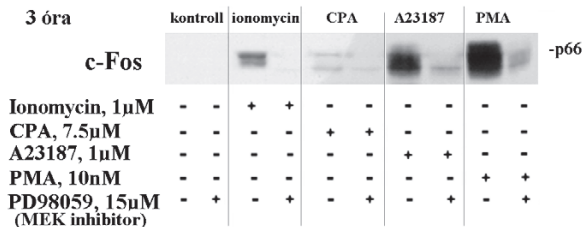
Az ERK1/2-MAPK jelátviteli útvonal egy későbbi tagját, a c-Fos transzkripció faktor expresszió változását vizsgáltuk c-Fos specifikus monoklonális ellenanyaggal 1h, 3h, és 6 óras mintákban. A c-Fos fehérje részt vesz a hemopoetikus sejtek szaporodásának szabályozásában. A különböző kezelések az ERK1/2 aktivációval összhangban indukáltak c-Fos expressziót (9.A ábra). Kontroll sejtekben nem detektáltunk; CPA csak alacsony szinten, leginkább csak 3 óras mintákban indukált; ionomycin 1 óras mintákban expresszált a legnagyobb mértékben c-Fos-t, míg a 6 óras mintákban egyáltalán nem; végül az A23187 és a PMA kezelt mintákban mindhárom időpontban fokozott expressziót detektáltunk.

A MEK-1 kináz gátlásával ellenőriztük, hogy a c-Fos expresszió valóban ERK1/2-MAPK útvonal-függő módon aktiválódik (9.B ábra). A MEK-1 gátlószert a kiindulási időpont előtt fél órával adtuk a sejtekhez, majd a 9.B ábrán mutatott kezelések szerint kezelt sejtek 3 óras mintáiból meghatároztuk a c-Fos expressziót. Mint a 9.B ábra mutatja a MEK-1 gátlása minden esetben negatívan hatott a c-Fos expressziójára.

A



B



9. ábra A c-Fos transzkripciósi faktor expresszió idő és kezelés függvényében (A), MEK-1 kináz specifikus gátlásának hatása a c-Fos expresszióra a Ca^{2+} emelő szerekkel vagy PMA kezelt sejtekben (B). 16 órás hormon megvonás után kezeltük a sejteket a feltüntetett anyagokkal. A MEK gátlószerrel a feltüntetett esetekben 30 percig előkezeltük a sejteket. A különböző mintákat c-Fos ellen megfestettük (lásd Anyagok és Módszerek) A fehérje felvitelt anti-ERK1/2 festéssel ellenőriztük. Az ábrák jellegzetes immunfestési képet mutatnak.

Összefoglalva, a c-Fos expresszió jól korrelált az ERK1/2 aktivációval. A CPA által kiváltott alacsony bifázikus ERK1/2 aktiváció csak a második csúcs után tudott c-Fos expressziót kiváltani; ionomycin a korábban meghatározott mindkét ERK1/2 aktivációs csúcs után, az aktivációval arányos mennyiségben idézett elő c-Fos expressziót, hasonló kinetikát tapasztaltunk a GM-CSF esetében is, a két ERK1/2 aktivációs csúcsot ebben az esetben is arányos c-Fos expresszió követte (nem bemutatott eredmény, lásd [80]; az A23187 és a PMA magas és fenntartott c-Fos expressziót idézett elő. $[Ca^{2+}]_i$ emelő szerekkel történő kezelésekkkel szemben, a c-Fos mennyisége PMA kezelés hatására idő függvényében nőtt. Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy az ERK1/2 aktiváció az utóbbi esetben még 6 órás mintákban is mindig a kiindulási érték több mint 300-szorosa volt. A PD89059 az összes mintában gátolta a c-Fos transzkripciósi faktor szintézisét jelezve, hogy ebben a folyamatban az ERK1/2 MAP kináznak kulcsszerepe van. A biológiai hatással összehasonlítva a kapott

aktivációs mintázatot elmondhatjuk, hogy az ERK1/2 szabályozott 2 fázisú aktivációja túléléshez vezet és amennyiben az ERK1/2 első aktivációs csúcsa elért egy küszöb értéket, ami c-Fos transzkripcióhoz vezet, akkor sejtosztódás is megfigyelhető, míg az ERK1/2 kináz hosszan tartó, magas aktivációs szintje, a jelátviteli út vonal tartós aktivációjához és apoptózishoz vezet.

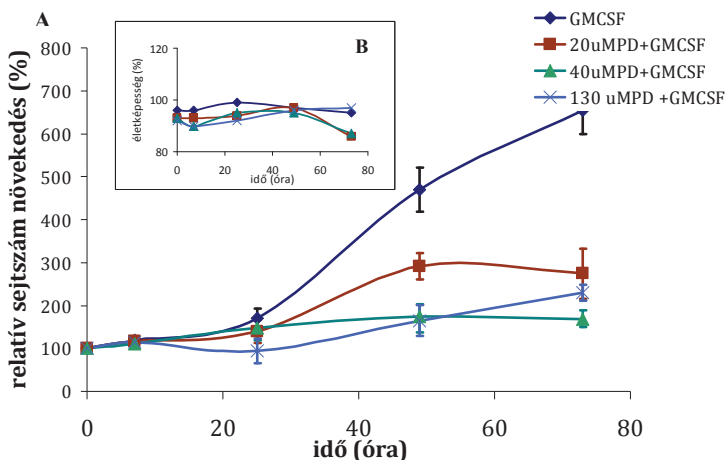
4.3. Ca^{2+} aktivált neutrális proteáz szerepe a sejtosztódásban

Az előző fejezetben bemutattuk, hogy a szabályozottan emelkedő majd lecsengő Ca^{2+} jel a TF-1 sejtekben hormon-független túléléshez és osztódáshoz vezetett. Feltételezhető, hogy az intracelluláris Ca^{2+} szint növekedés következtében a kalpain aktiválódik. Az irodalomban számos példa mutatja, hogy a kalpain a Ca^{2+} -jel dekodolásában, a jelátviteli folyamatokban, a sejt osztódásban és az apoptotikus folyamatokban is szerepet játszhat. Következő kísérlet sorozatunkban arra kerestünk választ, hogy a kalpain részt vesz-e a TF-1 sejtek osztódásában és túlélési folyamataiban. Azt találtuk, hogy szerepet játszik, s ezért elemeztük, hogy a sejtciklus melyik fázisára hat. Végül, azt vizsgáltuk, hogy a kalpain gátlásával befolyásoljuk-e a TF-1 sejtek túlélésében és osztódásban szerepet játszó legfontosabb jelátviteli folyamatokat.

4.3.1. Kalpain gátlás hatása a TF-1 sejtek életképességére és osztódására

Az irodalomban több tanulmány is foglalkozott a kalpain szerepével a sejtek életében. Kísérleteink a már ismert vizsgálatoktól elsősorban abban tértek el, hogy olyan sejtpermeábilis kalpain gátlószert alkalmaztunk, ami a korábbiakhoz képest nagyobb specifitással rendelkezik. A TF-1 sejteket 16-18 órán keresztül GM-CSF mentes médiumban tartottuk, hogy a növekedési jelek lecsengjenek, és a sejteket szinkronizáljuk. Ezt követően, a $t = 0$ h kiindulási időpontban a sejteket PD150606 specifikus kalpain gátlószert jelenlétében/vagy nélkül, ionomycin, CPA [Ca^{2+}]_i-emelő szerekkel, vagy a GM-CSF hormon visszaadásával kezeltük, majd 72 órán keresztül követtük a sejtszám és az életképesség változását. Kontrollként kezeletlen, hormon-mentes médiumban tartott sejteket használtunk. Az egyébként is apoptotizáló kontroll sejtekben a kalpain inhibitor tovább csökkentette az életképességet. Korábbi tapasztalatainknak megfelelően a GM-CSF visszaadása jelentős mértékű, míg a [Ca^{2+}]_i-emelő szerek az ionomycin és a CPA kisebb mértékű sejtszám növekedést okozott a vizsgált időszakban. Ezekben az esetekben a kalpain gátlás a sejtosztódás mértékét úgy csökkentette le, hogy közben az életképesség nem csökkent. A két utóbbi kezelés esetén az osztódási ráta alacsony, ezért nehéz a kalpain és a sejtosztódás szerepét ezekben a modellekben vizsgálni. Úgy döntöttünk, hogy további kísérletekben

először a GM-CSF jelenlétében vizsgáljuk a kalpain gátlás hatását a sejtosztódásra. Mivel a PD150606 specifikus kalpain gátlószert instabil és bomlékony, először naponta frissen újra adtuk a médiumhoz, 20 μ M illetve 40 μ M gátlószert, majd megvizsgáltuk, hogy milyen hatást vált ki az egyszeri 130 μ M gátlószert adása (10. ábra).



10. ábra Kalpain gátlószert hatása szinkronizált sejtek sejtszám változására (A) és életképességére (B). 16 óra hormon megvonás után 5 ng/ml GM-CSF-el kezeltük a sejteket és a feltüntetett mennyiségben előinkubáltuk PD 150606-al. A 20 μ l és a 40 μ l gátlószert hozzáadását 24 és 48 óra után megismételtük, míg 130 μ l-el csak a kezdeti időpontokban kezeltük a sejteket. A sejtszám és életképesség változásokat a feltüntetett időpontokban Tripán-kék-kizárásos módszerrel határoztuk meg. A sejtszám növekedést a kiindulási sejtszámról (100%) vonatkoztattuk. Az életképesség az élő sejt/összes sejt arányát tükrözi. Az adatokat legalább 3 független kísérlet alapján számoltuk (átlag \pm szórás)

A hormon megvonással szinkronizált sejtek száma GM-CSF visszaadás után egy kezdeti késleltetett fázist követően exponenciálisan nőtt, ezzel szemben a gátlószert jelenlétében az osztódás sebessége kisebbnek mutatkozott. Napi 20 μ M vagy 40 μ M PD150606 kezelés esetén 72 óra után a sejtszám csak 2,5-szeresére illetve 1,5-szeresére nőtt, ezzel szemben a csak GM-CSF-el kezelt sejtek száma 6,5-szörösére nőtt. Egyszeri 130 μ M gátlószert hozzáadása a kiindulási időpontban az első 24 órában teljesen leállította a sejtosztódást, majd a gátlás fokozatos megszűnésével a sejtek újra osztódni kezdtek, 48 óra után a sejtszám körülbelül 50%-al emelkedett. A gátlás feloldása feltehetően a gátlószert lebomlásának következménye. Tripán-kék kizárás alapján a gátlószert egyik alkalmazott koncentrációban sem befolyásolta a

sejtek életképességét, az első 2 napban minden esetben 95% feletti értéket kaptunk. Tehát a sejtosztódást a PD150606 koncentrációfüggően gátolta és a gátlás mértéke összeadódott, ha ismételtén adott a gátlószert (10. ábra).

4.3.2. A sejtciklus változás nyomon követése egy-paraméteres áramlási citométerrel

A kalpain hatásának részletesebb vizsgálatához, a lehetséges szubsztrátok körének leszűkítésére először azt kívántuk meghatározni, hogy a sejtosztódást melyik fázisban gátolja. A sejtciklus változást egy-paraméteres propidium jodid festéssel és áramlási citometriával (FACS) vizsgáltuk. Ez a módszer lehetővé teszi a sejtosztódás és életképesség változásának részletesebb nyomon követését, több betekintést nyújt azok dinamikájának változásába.

A DNS replikációja az S fázisban, míg a sejtosztódás az M fázisban történik. Ennek megfelelően az S fázis végén, valamint a G2 fázisban a sejtek a haploid genetikai állomány négyszeresét tartalmazzák, és csak az M fázis végére áll vissza a kiindulási állapot. Áramlási citométer segítségével a DNS-t sztöchiometrikusan jelölő propidium jodid festéket használva az egyes sejtpopulációkban pontosan meg tudtuk határozni, hogy a sejtek milyen hányada volt a festés pillanatában a G0/G1 fázisokban, illetve az S fázis elején; valamint, hogy mely sejtek tartottak az S fázis végén és melyek a G2/M fázisokban (lásd 1.B ábra). Mivel egyik kísérletünk során sem volt a sejttörmelék mennyisége szignifikáns, az S fázisban lévő sejtek hányada megegyezett a teljes populáció és a G0/G1 és G2/M sejtek hányadának különbségével, azaz $S\% = 100\% - (G0/G1\% + G2/M\%)$. A sejttörmelék mennyisége a sejtpusztulás mértékére utal, tehát ezzel a módszerrel sem láttunk sejtpusztulásra mutató jeleket.

A vizsgálat során összehasonlítottuk a hormon megvonással szinkronizált, majd különböző szerekkel kezelt sejtek osztódási ciklusát (11-12 ábrák). Az 11.A és a 12.A ábrák a GM-CSF –vel kezelt, az 11B ábra az ionomycinnel kezelt, az 11C ábra a CPA-val kezelt és az 12. B, C ábrák a GM-CSF kezelést megelőzően 30 perccel, míg az 12.D a kezelést követően 6 órával különböző mennyiségű PD150606-val kezelt sejtek sejtfázis hányad változását mutatja az idő függvényében. A szerek hozzáadása az ábrákon jelölt $t = 0h$ időpontban történt, a mintákat 3 óránként 30 órán keresztül vettük.

A hormon-megvonással szinkronizált TF-1 sejtek a hormonvisszaadást követően visszatértek a sejtciklusba. A sejtosztódásba történő visszakapcsolódás a kirakott sejtűrűségétől is függött (11.A és a 12.A). A 11A ábrán feltüntetett esetben nagyobb sejt koncentráció mellett fellépő

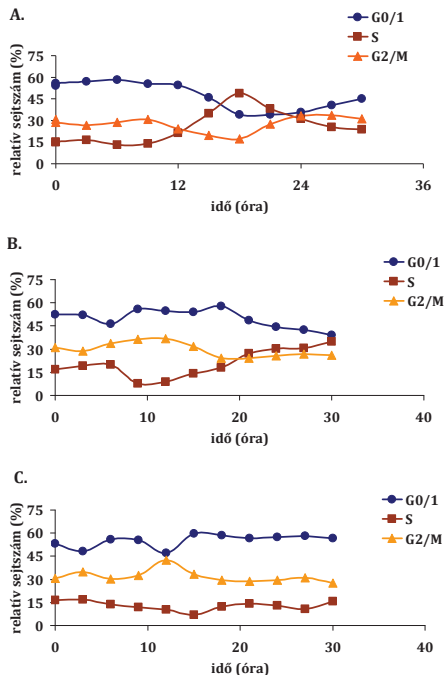
kontakt gátlás hatására mintegy 3 órával eltolódott ez az időpont az alacsonyabb sejtsűrűségnél (12A) mérthez képest. Kísérleteinket ettől az egy alkalomtól eltekintve, mindig alacsonyabb sejtsűrűség mellett végeztük, a 12A ábrán látható kísérletet legalább 4 alkalommal reprodukáltuk. A hormonvisszaadás után néhány órával megfigyelhető a G0/G1 fázisban lévő sejthányad csökkenése, párhuzamosan az S fázis hányadának növekedésével, ami jelzi, hogy a korábban G1 fázisban lévő sejtek, átléptek az S fázisba. Az alacsonyabb sejtsűrűség mellett S fázisban lévő sejtek mennyisége körülbelül 9 óra után kezdett nőni (12.A), és 15 óránál érte el csúcspontját. Ebből arra lehet következtetni, hogy körülbelül 6 óra alatt jutottak át a sejtek az S fázison. A kiindulási időpont után 15 órával a sejtmegoszlás a G2/M fázis javára eltolódott, az S fázis hányad csökkenésével párhuzamosan a G2/M aránya nőtt. A G2/M fázisban lévő sejtek hányada a kezelés utáni első 9 órában nem változott jelentősen, azaz a G2/M szakaszba belépő sejtek mennyisége megfelelt az osztódáson átment sejtek számával. Ezt követően a G2/M-ből kilépő sejtek száma meghaladta a sejtfázisba belépő sejtek számát, 15 órával a kiindulási időpont után érte el a G2/M sejtfázis hányad a minimumát; majd fokozatosan nőtt, és 6-9 órával később ismét csökkent. A sejtfázis-hányad dinamikus változása jelzi, hogy a részlegesen szinkronizált sejtciklusba visszalépő sejtek többsége mikor halad át az egyes fázisokon. Érdekes módon, a kezdeti szakasz hossza, amíg a sejtfázis hányadok nem változtak függött az alkalmazott sejt koncentrációtól. Nagyobb koncentrációban vizsgált sejtek gyorsabban visszaléptek a sejtciklusba (kb 6 óra után), mint kisebb sejt koncentrációban fenntartott sejtekkel.

A sejtszám változással mért eredményeinkkel összhangban a GM-CSF-el kezelt sejtekhez képest, az ionomycinnel kezelt sejtek lassabban haladtak a sejtcikluson, míg a CPA-val kezelt sejtek esetén a sejtfázis eloszlás az első 32 órában változatlan maradt. Ez utóbbi arra utal, hogy az osztódásra elkötelezett S, és G2/M fázisban lévő sejtek sem folytatták az osztódást (ezt a sejtszám és a G0/G1 hányad növekedése jelezte).

Amennyiben a GM-CSF visszaadása előtt kalpain gátlószerezrel kezeltük a hormon megvonással szinkronizált sejteket, a sejtek a gátlószerez mennyiségétől függően később folytatták az osztódást (12.B és 12.C ábrák). Minden esetben azt tapasztaltuk, hogy a kiindulási időszakban tapasztalt fázis eloszlás megrekedt a gátlószerez mennyiségétől függő ideig azaz, 9 óra helyet (GM-CSF) a gátolt sejtek csak 12 (GM-CSF + 40 μ M PD150606) illetve 18 óra (GM-CSF + 80 μ M PD150606) múlva kezdtek az S fázisba lépni. A sejtosztódás idejének eltolódása összhangban van a mért sejtszám változás adatainkkal. Ha a kalpain gátlószert, a hormon-visszaadás után 6 órával adtuk a sejtekhez, a gátlás hatása kitolódott, a vizsgált időintervallumban (21 óra) a különböző fázisokban lévő sejtek aránya nem változott

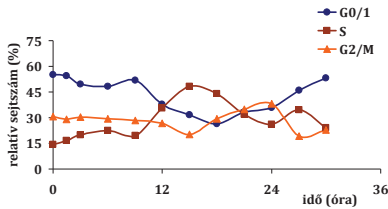
(12.D ábra). Feltételezhető tehát, hogy a gátlás az összes fázisra hat, és a gátlás fokozatos feloldódásának hátterében a gátlószer lebomlása áll.

11. ábra A sejtciklus változása GM-CSF (A), ionomycin (B), CPA (C) kezelést követően

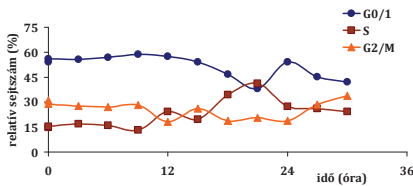


11. ábra A sejtciklus változása a GM-CSF(A) az ionomycin (B) és a CPA (C.) kezelést követően. 16 óra hormon-megvonás után kezeltük a sejteket a fent megadott szerekkel, majd 3 óránként mintát vettünk és 70% etanollal fixáltuk a sejteket. A propidium-jodidos festés után (lásd Módszerek) áramlási citométerrel elemeztük, a kapott adatokat ModFit programmal értékeltük ki.

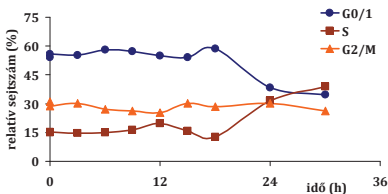
A.



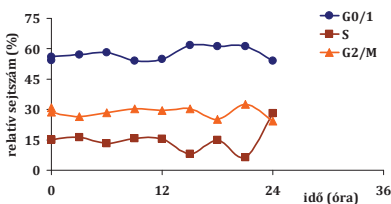
B.



C.



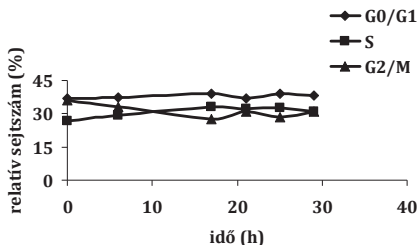
D.



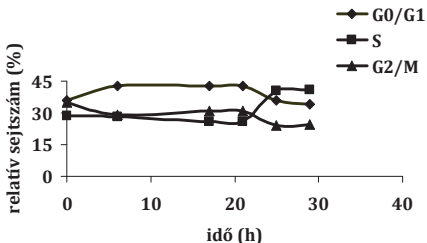
12. ábra A sejtciklus változása a GM-CSF(A), GM-CSF és 20 μ M(B), 40 μ M(C), 80 μ M (D) PD150606 kezelés után illetve 80 μ M PD150606 (D) követően, amikor a gátlószert a kiindulási időpont előtt 30 perccel (B-C) vagy 6 órával később adtuk (D). 16 óra hormon-megvonás után 30 percig a gátlószerezrel előinkubáltuk (B, C) a sejteket, majd GM-CSF-el kezeltük, illetve 6 órával a hormon kezelést követően adtuk a gátlószert a sejtekhez(D). A hormon-visszaadástól számítva 3 óránként mintát vettünk és 70% etanollal fixáltuk a sejteket. A propidium-jodidos festés után (lásd Módszerek) áramlási citométerrel meghatároztuk a sejtfázis hányadokat. A mért adatokat ModFit programmal értékeltük ki.

Mivel a szinkronizált sejtek vizsgálatából nem kaptunk egyértelmű választ arra, hogy a kalpain a sejtciklus mely fázisát gátolja a legjelentősebb mértékben, ezért a kalpain gátlás hatását folyamatosan GM-CSF hormon jelenlétében tenyésztetben tartott sejteken (mostantól „tenyészet” kifejezés jelöli) is vizsgáltuk. Mint a 13.A reprezentatív ábrán a sejt-fázis hányadok fluktuációján látható, a tenyésztetben lévő sejtek részlegesen szinkronizáltak. Ehhez képest az első 6 órában a gátolt sejtek G0/G1 hányada gyorsabban nőtt, míg a másik 2 fázis hányada ezzel párhuzamosan valamelyest csökkent (13.B ábra). Jelentősebb különbség csak 21 és 25 óra közötti mintákban tapasztalható, amikor a gátolt sejtek esetén a G0/G1 fázis jelentősen csökken, míg az S fázisban lévő sejtek hányada megnő. Azaz, ezalatt a 6 óra alatt jelentős mennyiségben lépnek át a G0/G1 fázisból a sejtek az S fázisba. A kísérlet többszöri ismétlésekor a kiindulási eloszlás nagy szórást mutatott, így a kapott eredmények nem vittek közelebb a gátlás mechanizmusának felderítéséhez. Ezért egy hatékonyabb módszerhez folyamodtunk.

A.



B.



12. ábra Sejtciklus változása a tenyésztet kontroll (A.) és 80μM PD150606 kezelést (B) követően.

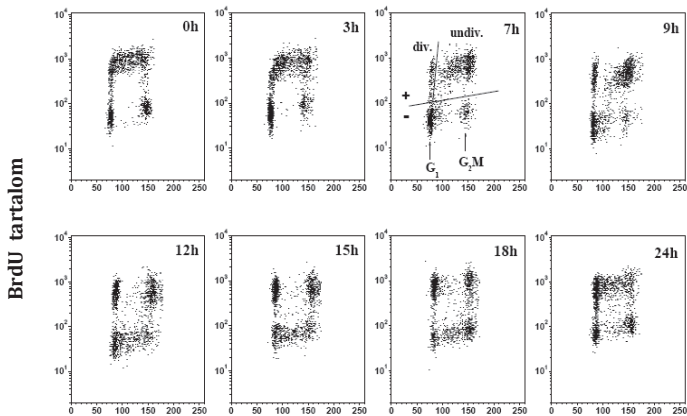
Folyamatosan tenyésztett sejteket kalpain gátlószer jelenlétében vagy nélküle tenyésztettük, majd 3 óránként mintát vettünk és 70% etanollal fixáltuk a sejteket. A propidium-jodidos festés után (lásd Módszerek) áramlási citométerrel elemeztük, a kapott adatokat ModFit programmal értékeltük ki.

4.3.3. Kalpain specifikus gátlás hatása a sejtciklus egyes fázisaira

Mivel az egy paraméteres sejtciklus vizsgálatokból úgy tűnt, hogy a kalpain minden fázisban szerepet játszik, ezért olyan módszert választottunk, amely lehetővé teszi a fázisok részletesebb vizsgálatát. A kalpain gátlás hatását a sejtciklus egyes fázisaira kettős jelöléssel vizsgáltuk, az úgynevezett jelöléskövető („pulse-chase”) módszerrel. Ha egy sejtenyészethez bróm-dezoxi-uridint (timidin analóg) adunk, akkor a sejtek felveszik környezetükből a BrdU-t, és a timidin helyére beépítik a növekvő, éppen szintetizálódó DNS molekulákba. A jelölés hatására mindazon sejtek tartalmazni fognak DNS molekulába beépült BrdU-t, amelyek a jelölés során S fázisban voltak. A BrdU jelenléte immunfluoreszcens módszerekkel kimutatható. A jelölés során S fázisban lévő sejtek aránya egy adott sejtpopuláción belül áramlási citométerrel meghatározható. A jelölés után a sejteket friss médiumban tovább tenyésztettük, majd különböző időpontokban vett mintákból meghatároztuk, hogy egy későbbi időpontban a BrdU-t felvett sejtek melyik sejtfázisban tartózkodnak. A BrdU jelölés időtartalma általában 15-60 perc között szokott lenni, mi 60 perc inkubációt választottuk, mivel a TF-1 sejtek nehezen jelölődtek. Szinkronizálatlan tenyészetet 1 órán keresztül BrdU-al inkubáltuk, majd ezt követően a sejteket lefugáltuk, lemostuk és 80 μ M PD150606 jelenlétében vagy nélküle (kontroll) tovább tenyésztettük. A korábbi FACS-os mérésekhez hasonlóan 3 óránként vettünk mintát. A kezelt sejtek a sejtciklus összes fázisában több időt töltöttek, mint a kontroll sejtek. A 13. ábra PD150606 kalpain gátlószerelemmel nem kezelt (14.A) és kezelt (14.B) sejtminták kettős jelölt BrdU-DNS hisztogramjait mutatja. A kettős jelölt BrdU-DNS hisztogramokon a jelölt BrdU+ sejtek és a jelöletlen BrdU- sejtcsoportok könnyen elkülöníthetők. A BrdU inkubáció során timidin helyett alkalmanként BrdU épül az S fázisban lévő, replikálódó DNS állományba. Tehát a BrdU+ sejtcsoport a kiindulási időpontban (t=0) S fázisban volt, vagy egy akkor S fázisban lévő sejt leánysejtjei, míg a BrdU- sejtek a pulzus jelölés során vagy a G0/G1 vagy a G2/M fázisban tartózkodtak, vagy ezen sejtek leánysejtjei.

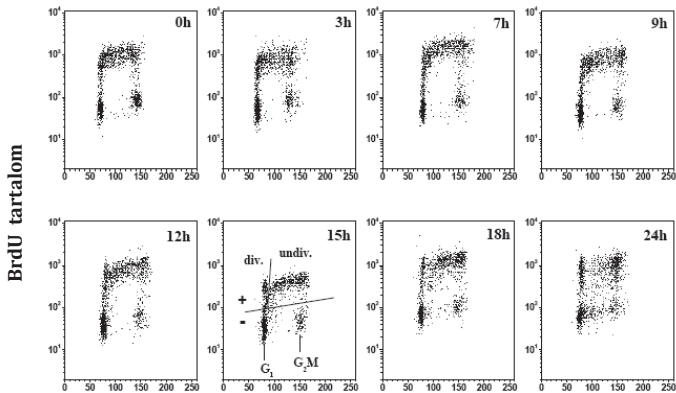
A.

DNS Tartalom



B.

DNS Tartalom



13. ábra Sejtosztódás nyomonkövetése a replikáló DNS BrdU pulse-chase jelölésével.

A. kontroll tenyészet B. 80 μ M PD150606 gátolt tenyészet. A sejtekhez a vizsgálat megkezdése előtt 1 órával bróm-dezoxi-uridint (BrdU) adtunk, majd friss médiumban tovább tenyésztettük, és a hisztogramokon jelölt időpontokban mintát vettünk. A jelölés során a DNS-be beépült BrdU molekulákat anti-BrdU antitesttel, majd FITC-el jelölt másodlagos antitesttel mutattuk ki. A sejtpopuláció adott időpontbeli sejtfázis eloszlását PI és anti-BrdU-FITC kettős festés után áramlási citometriával, Becton Dickinson FACS Calibur áramlási citométerrel határoztuk meg.

A hisztogramokon követhető a BrdU+ sejtek sejtciklus fázisokon történő áthaladása. A kezdeti időpontban ($t=0$) a jelölt sejtek a korai S fázis és a késői S fázis között egyenletesen oszlottak el. A kezeletlen, kontroll sejtek esetében a BrdU+ sejtek lassan folytatták a sejtosztódást, a 7 és 9 órás mintákon többségük már az S fázis végén vagy a G2/M fázisba lépett, a maradék részük ekkor már túl volt egy osztódáson, s utódsejtjei már a G1 fázisban voltak. A jelöléskor S fázis végén lévő sejtek utódsejtjei körülbelül 18 óra múlva jutottak ismét S fázisba (xx). Ezzel párhuzamosan a kontroll sejtenyészet BrdU- sejtei $t=7$ óránál jelentek meg először az S fázisban, majd ezen áthaladva körülbelül $t=12$ órára érték el a G2/M szakaszt. A kontroll tenyészethez képest, a gátolt sejtek osztódási sebessége jelentősen lelassult. Az első 12 órában a sejtek mintegy „befagytak”, a kiindulási ($t=0$) állapottal egyező eloszlási kép látható a hisztogramokon, a sejtcsoport „felhők” nem mozdultak. A gátlószer hozzáadásától számított körülbelül 15 óránál a sejtek egy része folytatja a sejtciklust, lassan kezdtek felszabadulni a gátlás alól. A kezelést követő 24 óra elteltével már jól látható, hogy a sejtek nagy többsége visszatért az osztódási ciklusba.

4.3.4. A két paraméteres pulse-chase jelölt minták eredményeinek kiértékelése

A kettős jelölt minták hisztogramjain jól követhető, hogy a kalpain gátlás a sejtciklus összes fázisát gátolja. Annak érdekében, hogy a gátlás befolyását az egyes fázisokra kvantitatívan is ki tudjuk elemezni egy megfelelő kiértékelési rendszerre volt szükség. Ezért, figyelembe véve a TF1 sejtek osztódásának mért paramétereit, egy olyan kiértékelési módszert dolgoztunk ki, amelynek segítségével követhető, hogy a sejtek mennyi időt töltöttek az egyes sejtfázisokban. Az alább bemutatott egyenletek segítségével meg tudjuk határozni, hogy a $t=0$ kiindulási időpontban G0/G1(0), S(0), G2/M(0) fázisban lévő sejtek, egy későbbi t időpontban, milyen mennyiségben maradtak ugyanabban a sejtfázisban (G1, S, G2/M). Emlékeztetőül, a kiindulási időpontban a G0/G1(0) és G2/M(0) fázisban lévő sejtek nem vettek fel bróm-dezoxi-uridint (BrdU-), míg az S(0) fázisban lévő sejtek felvették (BrdU+), mert a BrdU a jelöléskor csak a szintetizálódó DNS-be épül be. Az egyes fázisokból kilépő sejtek mennyiségét a gátlószer jelenlétében és nélküle a ... ábra mutatja. Az egyenletek megoldásához a FACS analízissel kapott sejtfázis-eloszlás adatokat és a kiindulási időpontban meghatározott összes sejt szám adatokat használtuk. A kiértékelésnél az elpusztult sejteket nem vettük figyelembe, mivel a kísérletek során - különösen az osztódó sejtek mennyiségéhez képest - a sejtpusztulás mértéke elhanyagolható. Az életképesség mindvégig meghaladta a 95%-ot. A kiértékelés arra az időintervallumra korlátozódik, amelyben teljesül, hogy a

hisztogramokon i.) a BrdU jelölt sejtek a jelöletlenektől egyértelműen elkülönülnek; és ii.) a leánysejt populációval a még nem osztódott sejtek csoportjai nem mosódnak össze.

A két-paraméteres hisztogrammokból az egyes t időpontokban vett mintákra meghatároztuk $\text{Br}^+(t) \rightarrow t$, a BrdU^+ sejteknek a minta összes sejtjeihez képest vett százalékát. Hasonlóan, meghatároztuk a még osztódás előtt álló BrdU^+ sejtek százalékát, $(\% \text{ud}^+(t) \rightarrow t)$. A BrdU -val nem jelölt sejtek mennyisége ennek megfelelően: $\text{BrdU}^-(t) = 100 - \% \text{ud}^+(t)$. A BrdU^+ sejtek t időbeli sejt-fázis hányadát a következőképpen határoztuk meg: a hisztogrammon kijelöltük a BrdU^+ populációt majd ábrázoltuk ennek eloszlását a DNS függvényében. Egy tipikus eloszlást az xx ábra szemléltet. Ezután illesztéssel, a ModFit program segítségével meghatároztuk a BrdU^+ populáción belül az egyes fázisok hányadát. Hasonló módon értékeltük ki a teljes populáció t időbeli DNS eloszlását is. Így, így megkaptuk a teljes $\%G1(t)$, $\%S(t)$ és $\%G2M(t)$ és $\%G1^+(t)$, $\%S^+(t)$ és $\%G2M^+(t)$ függvényeket. A BrdU^- sejtek sejt-fázis eloszlását az alábbiak egyenletek szerint számoltuk ki:

$$\%G1^-(t) = (100 \times \%G1(t) - \% \text{Br}^+(t) \times \%G1^+(t)) / \% \text{Br}^-(t) \quad (1)$$

$$\%S^-(t) = (100 \times \%S(t) - \% \text{Br}^+(t) \times \%S^+(t)) / \% \text{Br}^-(t) \quad (2)$$

$$\%G2M^-(t) = (100 \times \%G2M^-(t) - \% \text{Br}^+(t) \times \%G2M^+(t)) / \% \text{Br}^-(t) \quad (3)$$

Az így meghatározott sejt-fázis eloszlásokból a BrdU^+ és BrdU^- G0/G1, S és G2/M fázisok $t=0$ kiindulási sejtszámhoz viszonyított t időbeni sejtszámát az alábbi algoritmus szerint számoltuk ki.

Legyen $N^-(t)$ és $N^-(0)$ az összsejtszám a t illetve a kiindulási időpontban. Feltételezve, hogy a sejtpusztulás mértéke elenyésző, az $N^-(t)$ és $N^-(0)$ különbsége egyenlő a kiindulási időpont és t időpont között bekövetkező, osztódásból eredő sejtszám növekedéssel. Elsőként, a kiinduláskor a BrdU^- , G2/M-ben lévő sejtek osztódnak. Ebből az következik, hogy amíg a kiindulási időpontban G0/G1 fázisban lévő BrdU^- sejtek nem érik el a G2/M fázist, addig a BrdU^- lévő sejtek száma annyiival csökken amennyivel a G2/M-ben lévő BrdU^- sejtek száma az osztódások miatt csökken. Azaz:

$$N^-(t) - N^-(0) = N_{G2M}^-(0) - N_{G2M}^-(t) \quad (4)$$

ahol, $N_{G2M}^-(t)$ az összes G_2M -ben lévő BrdU- sejt abszolút számát jelenti.

A kétparaméteres hisztogramokról leolvasható, hogy a kiinduláskor G_0/G_1 fázisban lévő nem kezelt, tenyészetben lévő sejtek esetén 12 óráig, míg a kalpain inhibitorral kezelt sejtenyészet azonos alpopulációja még 24 óra elteltével is többnyire az S fázisban volt (ábra).

Az (4) képletet és a definícióinkat figyelembe véve, megkaphatjuk az alábbi egyenleteket:

$$\begin{aligned} N_{G2M}^-(t) = \\ = (N(0) \times \%Br^-(t)/100) \times (1 + \%G_2M^-(0)/100) \times \%G_2M^-(t)/(100 + \%G_2M^-(t)) \end{aligned} \quad (5)$$

A (5) egyenlet a t időpontig $G2M$ -ben maradó sejtek számát adja meg a korábban megadott feltételeket teljesítő időintervallumon belül, ahol a jobb oldalon megadott mennyiségeket kísérletes úton meg tudtuk határozni. A mennyiségeket a kiindulási és a t időpontban felvett hisztogramok kiértékeléséből kaptuk meg, kivéve $N(0)$ -t, a kiindulási időpontban mért abszolút sejtszámot, amit egy független méréssel hemocitóméterrel határoztunk meg. $N_{G2M}^-(t)$ és $N(0)$ ismeretében $N^-(t)$ is kiszámítható az (4) képlet és $N^-(0) = N(0) \times \%Br^-(0)/100$ felhasználásával.

$N_{resG1}^-(t)$ -vel jelöljük azon G_0/G_1 fázisban lévő sejtek számát, amelyek 0 és t időintervallum között változatlanul ebben a fázisban maradtak. Ahhoz, hogy megállapítsuk $N_{resG1}^-(t)$ értékét, le kell vonnunk az összes t időbeli G_0/G_1 fázisban lévő sejtek számából (azaz $N^-(t) \times \%G_1^-(t)/100$ -ból) a kiindulás óta osztódással G_0/G_1 fázisba kerülő sejtek számát. A t idő alatt keletkezett sejtek száma kétszerese a G_2/M fázisból osztódással kilépő sejtek számának:

$$N_{resG1}^-(t) = N^-(t) \times \%G_1^-(t)/100 - 2 \times (N_{G2M}^-(0) - N_{G2M}^-(t)) \quad (6)$$

Ez a képlet addig érvényes, amíg a BrdU- sejtek mitózisában csak azok a sejtek vesznek részt, amelyek a kiinduláskor G_2M -ben voltak. Tenyészetben lévő sejteknél TF-1 sejtek esetében ez az időszak körülbelül 15 órán át, míg a PD 150606 gátolt mintákban több mint 24 órán át tartott.

Hasonlóan az előzőekhez, meghatároztuk a 0 és t idő között változatlanul az S fázisban tartózkodó sejtek számát. A kiindulási időpontban S fázisban lévő sejtek mind BrdU+ sejtek. Az S fázisból történő kilépés sebességét a sejtek számából kapjuk meg. Elsőként, az alábbi

egyenlet alapján határoztuk meg a BrdU⁺, jelölés időpontja óta még nem osztódott sejtek abszolút mennyiségének időbeli csökkenését:

$$N_{ud+}(t) = N(0) \times \%Br+(t) / 100 (1 + \%ud+(0)/100) \times \%ud+(t) / (100 + \%ud+(t)) \quad (7)$$

ahol, $N_{ud+}(t)$ a nem osztódott (undivided), BrdU⁺ sejtek mennyiségét jelenti, t időpontban.

A (7) egyenletet a (5) egyenlethez hasonlóan kaphatjuk meg. Ha ismerjük $N_{ud+}(t)$ és $N(0)$ -t, akkor $N+(t)$ a következő képpen határozhatjuk meg:

$$N+(t) = N(0) \times \%Br+(0)/100 + N_{ud+}(0) - N_{ud+}(t) \quad (8)$$

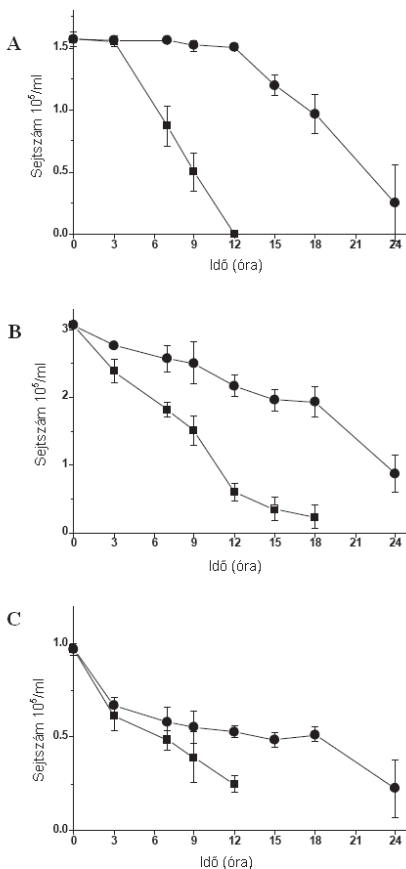
Mint ahogy mind az S⁺ és a G2M⁺ sejtek beletartóznak a még nem osztódott BrdU⁺ sejtek közé, a t időpontban S fázisban lévő sejteket az alábbi egyenlet szerint számolhatjuk ki:

$$N_{S+}(t) = N_{ud+}(t) - N_{G2M+}(t) = N_{ud+}(t) - N+(t) \times \%Br+(t) / 100 \quad (9)$$

A (9) egyenlet abban az időintervallumban érvényes, amíg a nem osztódott (undiv) BrdU⁺ sejteket egyértelműen meg lehet különböztetni az osztódott BrdU⁺ sejtektől. Tenyészetben lévő TF-1 sejtekben ez nagyjából $t=18$ óráig volt lehetséges, míg a kalpain gátolt sejtek esetén $t=24$ óráig tartott.

4.3.5. A kalpain gátlás hatása a sejtciklus fázisokon való áthaladás sebességére

A 4.3.4 alfejezetben részletezet kiértékelési módszerrel elemeztük a pulzus-jelöléssel végzett kísérleteink eredményeit. A függvények alapján meghatároztuk, hogy a sejtek az egyes fázisokban mennyi időt töltöttek. A 14. ábra ábrázolja, hogy a sejtek mennyi idő után hagyták el, azt a fázist ahol a kiindulási időpontban ($t=0$) tartozkodtak.



14. ábra A sejtek kilépésének kinetikája G0/G1 (A), S (B) és G2/M (C) fázisokból a kalpain gátlószer jelenlétében (●) és anélkül (■). A pulse-chase, kettős festéses eljárásban kapott mérési adatok eredményeit a szövegben részletezett függvényekkel számoltuk ki. A kiértékelő módszer a TF-1 sejtek mért osztódási paramétereire épült.

A részletes vizsgálat igazolta, hogy a kalpain gátlás késlelteti a sejtek áthaladását az egyes sejtfázisokon (15. ábra). Az 15.A ábra mutatja a kiindulási időpontban G0/G1 fázisban lévő sejtek számát - akik t időpontban még a G0/G1 fázisban vannak - az idő és a gátlás függvényében. Az első 3 órában a kalpain gátlástól függetlenül a sejtek nem léptek tovább az S fázisba. Ez feltételezhetően a jelölést követő mosás-fugálás lépésnek köszönhető, ami a

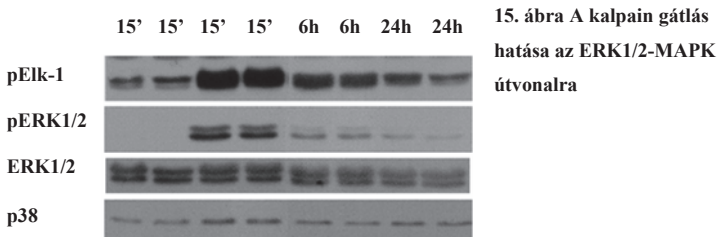
sejtekre stressz szignálként jelentkezhetett. Ezt követően a tenyészet sejtei fokozatosan átléptek az S fázisba, s túlnyomó többségük a kiindulástól számított 12 óra elteltével elhagyta a G0/G1 fázist. Ezzel szemben, az első 12 órában, a gátlószerrel kezelt sejtek nem hagyták el a G0/G1 fázist, és 24 óra elteltével még mindig maradtak eredetileg is ebben a fázisban lévő sejtek. Az S fázisban lévő sejtek (15.B ábra) esetében is a gátlás lelassult áthaladást, azaz a DNS szintézis késleltetését eredményezte. A tenyészet sejtei átlagosan 9-12 óra alatt haladnak át az S fázison, ezzel szemben a gátolt sejtek ezt átlagosan 21 óra alatt teszik meg. A G2/M-ben tartózkodó sejteknél a gátlás hatása a kiinduláshoz képest körülbelül 3 órával később jelentkezett, azaz a késői G2/M fázisban tartózkodó sejtek osztódása nem állt le se a gátlás, se a fugálás hatására (15.C). A gátlás mindhárom fázis esetében legkevesebb 12 órás hátráltatást jelentett.

Összefoglalva, a kalpain gátlás leállította mind a hormon-függő, mind a hormon-független sejtosztódást. Mi részletesen csak a GM-CSF által indukált sejtosztódásra kifejtett hatását vizsgáltuk. A gátlás reverzibilis és koncentráció-függő, sejtpusztulást nem vált ki, még magasabb koncentrációban sem. A különbözően kezelt sejtek sejtciklusának vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy a CPA teljesen berekeszti a sejtek sejtcikluson történő áthaladását, míg ionomycin kezelésnél a sejtek lassan osztódnak, GM-CSF kezelés esetén a részlegesen szinkronizált sejtek egy kezdeti álló fázist követően tovább haladnak az egyes fázisokon. Mind egy, mind kétparaméteres FACS analízissel azt kaptuk, hogy GM-CSF kezelt TF-1 sejtekben a kalpain gátlás leállítja a sejtcikluson történő áthaladást koncentráció-függő módon, a gátlószer adástól számított időponttól függően. A két-paraméteres jelölés kiértékelése során az alábbi megállapításokat vontuk le. A BrdU jelöléssel járó stressz (valószínűleg a fugálás) a G0/G1 fázisban lévő sejteket a kezeléstől függetlenül 3 órára leállította, míg a többi fázisnál a jelölés nem okozott észrevehető különbséget. A PD 150606 minden sejtre sejtfázistól függetlenül hatott, kivéve a G2/M fázis végén lévő sejtekre. A kalpain gátolt sejtek egyes fázisokon történő áthaladását a PD150606 legkevesebb 12 órával meghosszabbította. A kalpain gátlása TF-1 sejtek esetén tehát az osztódás több fázisát is érinti.

4.3.1 A kalpain gátlás hatása az ERK1/2 MAPK útvonalra

A kalpain gátlás nem befolyásolta a TF-1 sejtek életképességét GM-CSF, CPA, ionomycin kezelt sejtek esetén sem. Ugyanakkor, a sejtosztódást a kalpain gátló minden esetben

koncentrációfüggő és sejtfázis független módon leállította. Mivel a TF-1 sejtek osztódásában az ERK1/2 MAPK útvonal aktiválódása fontos szerepet játszik (lásd 4.1 fejezet), feltételeztük, hogy a kalpain szerepet játszik a jelátviteli útvonal aktiválódásában. Az Erk1/2 MAPK útvonal több tagján vizsgáltuk, hogy a kalpain gátlása milyen hatással van a jelátviteli útvonal aktivációjára. Különböző időpontokban követtük Western blot analízissel az Erk1/2, Elk-1, p-38 foszforilációját és a c-Fos, Bcl-2 és Egr-1 expressziót. Az aktivált p-ERK1/2-re specifikus ellenanyag segítségével vizsgáltuk az ERK1/2 foszforilációjának nagyságát és időfüggését a kalpain gátlószer jelenlétében és nélkül. A 16 órán keresztül hormon mentes médiumban tartott sejteket PD150606 gátlószerrel előkezeltük, majd fél óra elteltével GMCSF-vel kiegészítettük a tápfolyadékot. A kalpain inhibitor nem befolyásolta az ERK1/2 foszforilációját, se a korai (15 perc) se a későbbi (6h, 24h) időpontokban (16. ábra). A jelpálya többi vizsgált tagjának aktiválódását sem befolyásolta a kalpain gátlás (c-Fos, Bcl-2, Egr-1, nem közölt saját megfigyelés). A kalpain gátlása a Ca^{2+} emelő szerek hatására bekövetkező ERK1/2 aktivációt sem változtatta meg. Figyelembe véve, hogy a kalpain gátlószer 6 órával a GM-CSF hozzáadása után is hatásosan berekesztette – sejtfázistól függetlenül- az összes sejt osztódását feltételezhető, hogy a kalpain aktiválódás nem köthető a proliferációs szignál korai szakaszába, és egy későbbi szakaszban, az Erk1/2 MAPK útvonal után aktiválódik.



5. MEGBESZÉLÉS

Vizsgálataink során a különböző Ca^{2+} jelek biológiai hatását és az azt kiváltó jelátviteli mechanizmusokat vizsgáltuk humán mielo-eritroid sejtvonalon. Tanulmányunk második felében a Ca^{2+} jelátvitel egyik dekódolójának és effektorának, a kalpainnak szerepét vizsgáltuk ugyanazon sejtvonalon.

5.1. Ca^{2+} jeltől függő hormon-független túlélés, osztódás és apoptózis

Régóta ismert, hogy szabályozott $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedés feltétlen szükséges az osztódáshoz, míg hosszan tartó, magas $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedés a sejt pusztulásához vezet [9, 81, 82].

Különböző $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelőszerek segítségével humán hemopoetikus sejtvonalban szabályozott $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változások hatására *hormon független* túlélést és korlátozott mértékű osztódást tudunk kiváltani. Modellünkben a tartósan magas $[\text{Ca}^{2+}]_i$ apoptózishoz vezetett (2. táblázat, 3. ábra). Korábban egér hormon-függő hemopoetikus sejtvonalakban (Baf3, FDCP.P2 és IC-2) leírták, hogy Ca^{2+} ionofórok és SERCA pumpa gátlók csökkenthetik a hormon-megvonás okozta sejt pusztulás mértékét. Ugyanakkor, az említett esetekben 24 órán belül a sejtek életképessége drasztikusan lecsökkent [83-86]. Elmondhatjuk, hogy 7.5 μM CPA és 1 μM ionomycin kezelése hatására a TF-1 sejtek életképessége nem romlott az első 72 órában, sőt utóbbi, még osztódásra is készítette a sejteket. Ezzel szemben, az A23187 által kiváltott magas Ca^{2+} szint emelkedés gyors sejtpusztuláshoz vezetett (3. ábra).

A CPA által kiváltott $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedés nagyságrendileg megfelel a fiziológiásan előforduló Ca^{2+} jeleknek, amelyet az ATP, trombin és a tripszin kezelésekkal kiváltott Ca^{2+} jelekkel szemléltettünk (ábra). Az ATP és a trombin egyaránt ismert sejtmódulátorok, míg tripszint kis mennyiségben véredények endothél sejtjei és leukociták [87], nagyobb mennyiségben rákos sejtek és szövetek is szekretálnak [88]. Ezek az eredmények alátámasztják, hogy *in vivo* előfordulhatnak CPA vagy ionomycin kezeléssel kiváltott $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedésnek megfelelő jelek. A Ca^{2+} -transzport rendszer szabályozása révén is keletkezhetnek hasonló jelek, az intracelluláris raktárakból és a plazmamembrán csatornákon keresztül beáramló Ca^{2+} növekedés, esetenként meghaladhatja az 1 μM koncentrációt is.

A hosszantartó SERCA pumpa gátlás human vaszkuláris izomsejtekben nem járt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedéssel, viszont az endoplazmás retikulum Ca^{2+} raktárainak kiürüléséhez és a sejtosztódás teljes leállásához vezetett [89]. A mi esetünkben azonban, a SERCA pumpa

tartós gátlása $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést okozott, a Ca^{2+} raktárak újra feltöltődtek, és ismételten ki lehetett váltani a Ca^{2+} szignált (nem bemutatott eredmény).

A Bcl-2 család pro- és anti-apoptotikus fehérjéinek expressziós mintázatát vizsgáltuk, hogy azonosítani tudjuk az $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés által kiváltott túlélési mechanizmus hátterében zajló folyamatokat. Egy korábbi munkánkban megmutattuk, hogy hormon megvonást követően a GM-CSF visszaadása a Bcl-2 és a Bcl-xl szintjeit egyaránt növelte [67]. Jelen eredményeink azt mutatták, hogy a hormon-független túlélés esetében is jelentősen emelkedett a Bcl-2 szintje, míg a Bcl-xl az ionomycin kezelés hatására nőtt, de a CPA esetében nem tapasztaltunk jelentős emelkedést. A Bax fehérje mennyisége egyik esetben sem változott (7. ábra). Az A23187 kezelés, illetve a MEK-1 specifikus gátlását követő gyors sejtpusztulás nem tette lehetővé a pro- és anti-apoptotikus fehérje szintek hosszú távú nyomon követését. A 12 órás mintákban a Bcl-2 fehérje csökkenése kimutatható volt (4. táblázat, illetve nem bemutatott saját megfigyelés).

A Bcl-2 kifejeztetése TF-1 sejtekben hormon-független [90] túlélést eredményezett. Későbbi tanulmányokban szintén a Bcl-xl kifejeződésén keresztül menekültek meg a TF-1 sejtek a sejtpusztulástól más úton kiváltott hormon-független túlélésekor (HIV-1 vírus Nef fehérjéje expresszió, mutáns Shp2E76K foszfatáz), [91, 92]. Érdekes módon, Ren és munkatársai TF-1 sejtekben, még GM-CSF hatására sem mutatták ki a Bcl-2 jelenlétét [92]. Mindkét esetben, hasonlóan a Ca^{2+} kiváltotta túléléshez, az ERK1/2 jelátviteli kaszkád közvetítette a hormon-független túlélést. Mind a Bcl-2, mind a Bcl-xl képes az apoptózis megelőzésére az $[Ca^{2+}]_i$ mérséklésén keresztül [93]; többek között a Ca^{2+} beáramlás csökkentésével [94] és az intracelluláris Ca^{2+} raktárak befolyásolásával [95, 96]. Mindkét anti-apoptotikus fehérje képes fizioiogiás Ca^{2+} jelek és oszcillációk erősítésére, és ezen keresztül szerepet játszanak a túlélésben, illetve a sejtostódásban [97, 98]. Ezek a fehérjék szerepet játszhatnak abban, hogy bár a Ca^{2+} emelő szerek folyamatosan a médiumban maradtak, mégsem okoztak hosszan fenntartott Ca^{2+} jelet.

5.2. Az ERK1/2-MAPK jelátviteli út időbeli és mértékbeli aktiválódása Ca^{2+} jel függvényében határozza meg a kiváltott biológiai hatást

GM-CSF növekedési faktor több jelátviteli útvonalat aktivál. Spontán hormon-független TF-1 sejtek túlélésében a Raf-1 MAP kináz útvonal feltételezhető szerepére már korábban rámutattak [99]. Ezenfelül, az ERK1/2-MAPK jelátviteli útvonal fontos szerepet játszik a Bcl-2 kifejeződésében [100, 101]. Munkánk során megmutattuk, hogy a megemelkedett $[Ca^{2+}]_i$ az ERK1/2-MAPK jelátviteli kaszkádot Ca^{2+} jel függő módon aktiválta (ábra). Az ERK1/2

aktivációja szükséges a Bcl-2 expresszió növekedéséhez és a c-Fos transzkripciós faktor kifejeződéséhez. Utóbbi expressziójához, az ERK1/2 foszforilációjának el kell érnie egy küszöb értéket [80]. A MEK1 kináz gátlása pedig gyors sejtpusztuláshoz vezetett (4. táblázat). Az ERK1/2 kináz mérsékelt aktivációja szükséges a sejtosztódáshoz, ugyanakkor hosszantartó aktivációja sejtciklus leálláshoz, sejtciklusból történő kilépéshez illetve apoptózishoz vezethet [21, 102-104]. Az is valószínű, hogy az ERK útvonal aktiválódásának elmaradása szintén szerepet játszik a sejtek halálában. A Raf-1/ERK útvonal aktiválódása ugyanis kulcsfontosságúnak tűnik a Bcl-2 fehérje mennyiségének [105] és a Bad fehérje foszforilációjának [106] szabályozásában és ezeken keresztül a hemopoetikus sejtek apoptózisának gátlásában.

Érdekes kérdés az, hogy melyik fehérje az, amely a Ca^{2+} jelet közvetíti a MEK1/ERK1/2 útvonalra. Több lehetőséget is megvizsgáltunk: a Ca^{2+} -függő MAPK aktiváció kalmódulin-függést nem mutatott; a PKC gátlás kis mértékben még fokozta az ERK foszforilációt; a kalpain gátlás sem befolyásolta az ERK1/2 aktivációt. Egyedül a kalcineurin (CN) gátlása emelte meg az ionomicinnel kiváltható sejtszám emelkedést, ez azonban nem az ERK1/2, hanem az Elk-1 transzkripciós faktor aktivitásának növekedésén keresztül történt (nem bemutatott saját megfigyelés). Ez feltehetően annak köszönhető, hogy a CN képes ezt a transzkripciós faktort defoszforilálni, így gátlása az Elk-1 foszforiláció növekedéséhez és ezen keresztül a c-Fos és Egr-1 fehérjék mennyiségének és a sejtszámnak az emelkedéséhez vezet. GM-CSF kezelés mellett a CN-nak nincs ilyen hatása a vizsgált folyamatokra, ami érthető, mert TF-1 sejtekben a GM-CSF kezelés nem okozott $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedést.

Az ERK1/2 aktiválódásának időbeli lefutása meghatározhatja a sejt különböző válaszait, beleértve az osztódást [21] és az apoptózist is. Kísérleteink eredményei azt mutatták, hogy GM-CSF, illetve ionomycin hatására az ERK1/2 két hullámban aktiválódott, a sejtek bejutottak az S fázisba, majd osztódtak (11. ábra). A CPA kezelés hatására az ERK1/2 jelentősebb mértékben csak egyszer, késleltetve aktiválódott, amely csak a sejtek túléléséhez bizonyult elegendőnek. Ez a megfigyelésünk összhangban van a Jones és Kazlauskas [107] cikkében leírtakkal, amelyben arról számolnak be, hogy az NIH3T3 sejtek növekedési hormonnal előidézhető osztódásához is két elkülönülő fázisú jel szükséges, és egy még korábbi tanulmányban ahol, a PDGF-en keresztül kettős ERK1/2 aktivációs hullámot idézték elő [108]. Hasonlóan, egy másik növekedési hormon, az EGF (epidermal growth factor) is két hullámú ERK1/2 aktivációt okozott humán kötőhártya szövetből izolált sejtekben, de ebben az esetben a második hullám felelt a sejtosztódásért [109]. Humán emlő sejtek osztódásakor is megfigyelték a kettős hullámú ERK1/2 foszforilációt [110], ami a kiváltó jel függvényében

EGFR aktiválásán keresztül vagy más úton is kialakult. Szintén humán emlő sejtvonalon vizsgált D vitamin aktív komponens, a calcitriol is kettős ERK1/2 foszforilációs hullámost váltott ki, ahol az első hullám általánosan indukálható, a második már D vitamin receptor függő volt [111]. A D vitamin receptor függő pályák elsősorban a sejtciklus elhagyására és differenciáció vagy apoptózis felé irányítják a sejteket.

Az ERK1/2 kétfázisú aktiválódásának, az általunk fenntartott kísérleti körülmények között, feltehetően az ERK1/2 és Ca^{2+} -függő MAPK foszfatáz-1 átmeneti aktiválódása lehet az oka [112]. Egy másik lehetséges szabályozó, a protein foszfatáz-2A (PP2A), amely a Raf-1 defoszforilációján keresztül szintén szerepet játszhat az ERK1/2-MAPK pálya aktivációjában, és a sejtek osztódásában [113].

A mi rendszerünkben a TF-1 sejtekben a magas, hosszan tartó ERK1/2 aktiváció a kiváltás módjától függetlenül apoptózishoz vezetett (PMA, A23). Irodalmi adatok alapján, a Raf-1/MEK-1/ERK1/2 pálya tagjainak konstitutív aktivációja eltérő biológiai választ ad például: TF-1 sejtekben a konstitutívan aktív mutáns Shp2^{E76K} foszfatáz, az ERK1/2 kináz aktivációján keresztül hormon-független túlélést és osztódást váltott ki, ugyanakkor, konstitutívan aktív MEK1 mutáns nem képes a TF-1 sejtek transzformálására [92]. A Raf-1 konstitutív aktivációja egér eritroid-leukémia sejtvonalban apoptózist indukál, ami MEK1 gátlással kivédhető [114]. Primér erithroid progenitor sejtekben konstitutívan aktív MEK1 és Akt kináz hormon-független növekedéshez vezetett, míg konstitutívan aktív Raf sejtpusztulást eredményezett [115].

Az ERK1/2 út vonal különböző mértékű aktivációját és az ezzel összefüggő eltérő biológiai hatást mások is megfigyelték. Ca^{2+} indukálta jelhez hasonlóan az azbeszt [116], és a genistein, egy szójában található flavon [117] is két lépcsős hatást vált ki. Alacsony koncentrációban osztódást, míg nagyobb mennyiségben apoptózist indukál. Az azbeszt kezelés mértékével arányos a p-ERK1/2 mennyisége a magban. [116].

Az ERK1/2 út vonal aktiválódási mintázata (pl. konstitutív aktiváció TF-1 sejtekben), jó példa arra, hogy még hasonló sejtekben, hasonló körülmények között is mennyire különböző biológiai hatást válthat ki (pl. apoptózis vs túlélés). A rendszer összetettségét kiemeli, hogy egyazon sejtben a kiváltó ágens mennyiségének függvényében mennyire eltérő aktivációt mutat. Mind az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ szabályozó mechanizmusok, mind az Raf1-MEK1/ERK1/2 MAPK út vonalak gyakran célpontjai rákellenes gyógyszer fejlesztéseknek. Az általunk felvázolt rendszer figyelmeztet, hogy terápiás szer kialakításánál nagy odafigyelést igényel, hogy a szervezetben egyenlőtlenül felszívódó aktív ágensek alacsonyabb koncentráció esetén se

váltsanak ki eltérő hatást, és elkerüljük a malignus sejtek osztódásának vagy túlélésének elősegítését.

5.3. A kalpain specifikus gátlása TF-1 sejtek osztódását gátolja, anélkül, hogy a sejtciklus leállás az életképességet befolyásolná. A kalpain a sejtek osztódásának tovább haladását legalább 3 helyen szabályozza.

Az ubiquitin-proteaszóma rendszer kulcsfontossága a sejtciklus szabályozásban vitathatatlan [118-120]. Ugyanakkor, egyre több figyelem fordul a sejtciklus finom szabályozásában résztvevő egyéb proteázokra, ezek közül munkánk második részében a kalcium aktiválta neutrális proteázzal, a kalpainnal foglalkoztunk. Vizsgálatainkhoz humán CD34+ mielo-eritroid sejtvonalat használtunk (TF-1), ami a fiziológiás körülményeket megfelelően modellezi, a csontvelőben zajló eritroid differenciációhoz is szükséges hormon-megvonással szinkronizálható [121, 122]. Ezáltal elkerülhető más tanulmányokban alkalmazott mesterséges anyagok felhasználása a sejt kultúra szinkronizálásakor [48, 49, 60, 123]. A PD 150606, a kalpain kalmodulinszerű Ca^{2+} kötő doménéhez köt, más proteáz aktivitását ezért nem befolyásolja [124]. Nagy szelektivitása miatt gyakran alkalmazzák a különböző kalpain funkciók vizsgálatára. Jelenlegi tudásunk szerint, egyedüli mellékhatása a Ca^{2+} -permeábilis AMPA receptorok gátlása [125], ugyanakkor a humán mielo-eritroid progenitor sejteken nem ismert a receptor kifejeződése.

A TF-1 sejtek szaporodása PD150606 jelenlétében GM-CSF (ábra), CPA és ionomycin (nem közölt saját megfigyelés) kezelés mellett egyaránt mérséklődött az életképesség csökkenése nélkül. A proteaszómat is hatékonyan gátló Calpain Inhibitor I kezelés hatására is csökkent a TF-1 sejtek osztódása, de jelentős toxicitása, és alacsony specificitása miatt részletes vizsgálatát nem folytattuk (nem közölt saját megfigyelés). Figyelmünket elsősorban a hormon-függő osztódás és a kalpain kapcsolatára összpontosítottuk, mert i) a sejtek osztódási rátája magasabb volt, ezért könnyebben vizsgálható a rendszer; és ii) nem okoz detektálható Ca^{2+} emelkedést, ezért reméltük, hogy közelebb kerülünk az *in vitro* körülmények között, aktiválásához szükséges magas Ca^{2+} és a sejten belüli fiziológiás Ca^{2+} különbség paradigmájának megértéséhez. *Célunk az volt*, hogy azonosítsuk a gátlás helyét a sejtciklus folyamatában, hogy abból kiindulva könnyebben felismerjük a kalpain szabályozásban érintett szubsztrátokat, és közelebb kerüljünk a kalpain aktiválódásához szükséges feltételek megértéséhez.

A sejtszám és életképesség meghatározás mellett, a sejtfázis hányad változását 24-32 órán keresztül, 3 óránkénti mintavétellel, és áramlási citométerrel követtük; illetve hasonló körülmények között *pulse-chase* kettős jelöléssel elemeztük a sejtek áthaladását az egyes fázisokon. A sejtek DNS mennyisége alapján három fázist lehet elkülöníteni: i) a G0/G1 fázist (2n haploid kromoszóma) ii) a G2/M fázist (4n haploid kromoszóma) és iii) az S fázist (2n-4n közötti haploid kromoszóma állomány). A DNS tartalom alapján nem lehet elkülöníteni a korai és a késői S fázist, a G1 és a G2 fázisoktól.

i.) A G0/G1 fázisok gátlása, feltételezhető szubsztrátok

A sejtfázis-hányadok időbeli változásának elemzésekor már feltételeztük, hogy a kalpain gátlás sejtfázistól függetlenül gátolja a sejtek osztódási folyamatát (ábra). Szinkronizált sejtek vizsgálatakor, a sejtciklus hányad kezdeti stabilis megoszlása PD150606 jelenlétében a kontroll sejtekhez képest sokkal tovább fennállt („berekedt”). Továbbá, tenyészetben fenntartott sejtek gátlásakor nem tapasztaltuk egyik sejtfázisban sem a sejtek jelentős felhalmozódását (13. ábra). Feltételezésünket alátámasztotta a részletes *pulse-chase* vizsgálat és annak beható kiértékelése. A kalpain gátlás a sejtciklus mindhárom, FACS-al elkülöníthető szakaszán képes az osztódási folyamatot reverzibilisen leállítani. A 16-18 órás hormon-megvonás hatására a sejtek többsége kilépett az osztódási ciklusból, és többségük a G0/G1 fázisban felhalmozódott a kiindulási időpontban ($t=0$). A növekedési hormon (GM-CSF) visszaadás hatására a sejtek osztódása újra aktiválódott. Az osztódásra felkészüléshez szükséges kezdeti fázis után a DNS szintézis elindul. Ez a kezdeti szakasz körülbelül 9 órával meghosszabodott 80 μ M PD 150606 jelenlétében (12 ábra). A sejtciklusba történő visszalépés ideje az alkalmazott gátlószer mennyiségével arányosan hosszabbodott (12A-C ábrák), illetve hossza függött a kirakott sejtek sűrűségétől (11A és 12A ábrák). A kalpain gátlás mértéke fibroblaszt sejtek esetében is függött az alkalmazott sejtűrűségtől [126].

Eredményeink szerint, a gátlószer jelenlétében a G0/G1 fázisban több időt töltöttek a TF-1 sejtek, mint nélküle. A *pulse-chase* vizsgálat alapján, 80 μ M PD 150606 mintegy 12 órával hosszabbította meg ezt a szakaszt. A sejtek feltehetően a G1-S ellenőrzési pont molekuláris mechanizmusai feltartoztatták, illetve egy kis részük esetleg még a nyugalmi állapotból (G0 szakasz) sem lépett ki. A kalpain szubsztrátjai között több osztódásban résztvevő transzkripciós faktor is szerepel pl. a c-Fos, c-Jun [47]. A kalpain gátlás nem befolyásolta a GM-CSF hatására létrejövő MEK1-ERK1/2-Elk1-cFos útvonal korai és késői aktiválódását (15. ábra), és ugyanúgy, az ionomycinnel vagy CPA-val indukált jelátvitel esetén sem (saját, nem publikált megfigyelés). Ebből arra következtethetünk, hogy a kalpain az ERK1/2

útvonalától függetlenül, vagy annak egy későbbi, leágazó szakaszában aktiválódik. Ez utóbbit támasztják alá, azok a megfigyelések, miszerint a sejtek sejtváándorlása során a kalpain aktivitás [127-130] és expresszió [131] ERK1/2 függő illetve p42-ERK és a μ -kalpain komplexet alkot [132]. Idegsejtekben az ERK1/2 és a kalpain aktiválódás korrelált [133, 134], ami közös vagy átfedő „upstream” szabályozásra utal.

A G1-S határán feltételezett blokádnak összhangban van a korábbi elképzelésekkel, mely szerint, a kalpain részt vesz abban a döntési folyamatban, ami után a sejtek visszafordíthatatlanul elindulnak a sejtosztódás irányába, és megkezdődik a DNS duplikációja.

Az irodalomban, több olyan kalpain szubsztrát is ismert, amin keresztül az enzim, a G1-S átmenet szabályozásában részt vehet. Az egyik elképzelhető célpont a ciklin D1, melynek lebontását főképpen az ubiquitin-proteasóma rendszer végzi, de bizonyos esetekben a kalpain szabályozza [49, 135]. A kalpain gátlás hatására a Cdk2 és/vagy Cdk4 kinázok sem aktívak, a pRb hipofoszforilált marad, és nem aktiválódik a DNS duplikációhoz szükséges gének [51, 64]. A kalpasztatint magasan kifejező *v-src* transzformált fibroblasztokban is megfigyelhető a sejtek felhalmozódása a G1 fázisban; feltételezhetően az alacsony ciklin A, ciklin D és a cdk2 kináz mennyiségének és a hipofoszforilált pRb-nek köszönhetően [136]. A ZLLY-CHN₂ a p53 fehérje lebontását gátolta és a WI-38 fibroblaszt sejtek osztódása a késői G1 fázisban megállt, ugyanakkor ez a kezelés a ciklin D1 mennyiségét nem befolyásolja [48]. A p53 [48, 64, 126, 137-139] és a retinoblasztóma családba tartozó p107 [52] lebontását több *in vitro* kísérletben leírták. A p53 szabályozásán keresztül, vagy más utakon a kalpain a G0 fázisból történő kilépést is befolyásolhatja [140, 141]. A Cdk inhibitorok közül a p21 [48, 50, 64, 138], a p27 [51, 142], és a p19^{Ink4d} [143] proteolízisében feltételezik szerepét. Meg kell jegyezni, hogy nem minden esetben a kalpain felelős az említett gátló fehérjék lebontásában [144].

ii.) Az S fázis gátlása, feltételezhető szubsztrátok

A vizsgálataink részletes kiértékelésekor, a sejtciklus kinetikai elemzése rámutatott, hogy a gátlószér jelenlétében a sejtek sokkal több időt töltenek el az S fázisban, mint anélkül. Időközben alátámasztották, hogy a kalpain valóban fontos tényező az S fázison történő áthaladáshoz [145, 146]. Tengeri sünn embriók osztódása során az M fázisba történő belépés előtt kívánatos a cisztein proteázok tevékenysége. Blokkolása E64d-vel jelentős mértékben csökkenti a BrdU beépülést; rendellenes lesz a centroszómák és a mikrotubulusok eloszlása; a DNS dekonzenzáció zavart, a sejtmaghártya nem bomlik fel; ciklin B nem tud a magorsóhoz kötni, a ciklinB-cdk2 komplex aktivációja késik, és végül a citokinezis nem következik be.

A kalpain az S fázist feltételezhetően több szubsztrátján keresztül is modulálja. A G1-S átmenethez hasonlóan, elképzelhető, hogy az S fázishoz szükséges gének transzkripciója leáll esetleg a pRb hipofoszforiláltsága, és vagy a homológjának, a p107 stabilizálása révén. A ciklin D1 szint az S fázison történő áthaladás egyik biomarkere; degradációja az S fázis leállást jelzi [147]. A prosztata eredetű daganatsejtek osztódásában a kalmodulin-androgén receptornak (AR) fontos szerepe van, mennyisége a sejtciklus G1 fázis végére megnő, majd az S fázisban fokozatosan degradálódik. Pelley és munkatársai kimutatták, hogy az AR proteolízisében a kalpain játszik központi szerepet, gátlása az osztódás késleltetéséhez vezet. A kalpain indirekt módon is befolyásolhat egyes ellenőrzési pontokat. Valószínűleg közvetlenül nem vesz részt a BRCA1 proteolízisében [148], bár ALLN gátolja [149], de a BRCA1-hez kötődő BARD1 fehérjét hasítja, és ezzel a megváltozik a kölcsönhatásuk. A hasítási termékként létre jövő p67 peptid fontos szerepet játszik a kaspáz-független apoptózis kiváltásában [150]. A funkcionális BRCA1 fehérje hiánya genetikai instabilitással jár, amit a sejtciklus ellenőrzési pontjainak sérülése okoz. A BRCA1 egyaránt részt vesz az S-fázis, a G2/M, a magorsó és a centroszóma duplikáció ellenőrzési pontjain [151].

Eredményeinkkel összhangban, prosztata eredetű daganatokban a kalpain és a kalpasztatin szintek változnak a sejtciklussal [146]. A citoszolikus kalpain szintek a sejtciklus korai szakaszában érték el maximumukat, majd a G1 szakasz végére lecsökkentek és az S fázis közeledtével szintjük ismét emelkedett [146]. A citoszolikus kalpasztatin szintje nagyjából tükrökepe volt a kalpainénak. A sejtmagban, a kalpain a korai G1 fázisban érte el minimumát, majd a sejtciklus előre haladtával fokozatosan emelkedett, és az S fázis alatt tetőződött.

iii.) A G2/M fázisok gátlása, feltételezhető szubsztrátok

Végül, kimutattuk, hogy a kalpain gátlás a G2/M szakasz hosszát is jelentősen megnövelte (ábrák). A BrdU-val kiértékelt vizsgálatok alapján a kalpain gátlás nem befolyásolta a mitózis végén tartó sejteket, ami jelzi, hogy az első 3 órában a gátlás nem befolyásolta a G2/M fázisban lévő sejtek osztódását (ábra). A G2/M fázis gátlását már 1988-ban kimutatta Schoellmeyer [152], ugyanakkor a vizsgálatainak nem volt folytatása, ezért nehéz megállapítani a pontos molekuláris mechanizmust. Mitóziskor, a sejt fokális adhéziójában résztvevő paxilint az m-kalpain hasítja [153]. Ansamycin kezelés hatására glioblastoma sejtek G2/M fázis határán megállnak, majd apoptózissal elpusztulnak [154]. A kalpain aktiváció korrelált a cdc2 és cdc25a kinázok mennyiségének változásával: az ansamycin kezelés hatására lecsökkent, amit kalpain inhibitorokkal meg lehetett előzni. Mitózis alatt a kalpainok és endogén inhibitorának a sejten belüli eloszlásának változásáról számoltak be,

ami szintén kalpain aktivációra utal [155]. Profázisban leállított oocyták meiózisa újraindul, ha a sejtmagba kalpaint injektálnak [156]. Prometáfázisban, a kromoszómák helytelen ellenrendeződése miatt a sejtek osztódása m-kalpain RNS interferencia hatására megakad [157].

Összefoglalva, tanulmányunk során megmutattuk, hogy a kalpain specifikus gátlása reverzibilisen leállítja a TF-1 humán mielo-eritroid sejtek osztódását. Ez a gátlás a sejtciklust több helyen is érinti. A sejtek áthaladását az egyes fázisokon lassította. Irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy a kalpain mely szubsztrátjának lízisén keresztül segíti az osztódást. Érdekes lenne megvizsgálni a tanulmányunkban leírt modell felhasználásával azokat a sejtciklusra jellemző szubsztrátokat, amelyek szabályozásában az irodalmi adatok alapján az ERK1/2 és kalpain is egyaránt részt vesznek, így pl ciklin D1, p21, p27Kip, p53. Minthogy, a kalpain az összes létfontosságú mechanizmus részt vesz (osztódás, differenciáció, apoptózis stb) fontos lenne megérteni, hogy milyen jelek aktiválják, és mi befolyásolja az aktuális szubsztrát választásban. További kutatások szükségesek a kalpain sejtciklus alatti aktiválódásának direkt alátámasztására. A közelmúltban kifejlesztettek olyan új technológiákat, melyek lehetővé teszik a kalpain *in vivo* aktivációját [40], és aktivációjának követését [32, 158], melyek segítségével közelebb kerülhetünk a kalpain aktiválódás helyének és mechanizmusának megértéséhez, valamint célpontjainak feltérképezéséhez. Ezáltal talán arra is választ kapunk, hogy mi határozza meg, hogy a kalpain a sejtosztódás, apoptózis vagy egyéb sejtfunkció kivitelezésében játszik egy adott pillanatban szerepet. Egy másik érdekes irány a kalpain *in vivo* Ca^{2+} és/vagy ERK1/2 -függő aktiválódásának meghatározása lehet. Elképzelhető, hogy a sejtciklus egyes szakaszaiban csak a mag, vagy a mag közelében elhelyezkedő ER egyes elszigetelt mikrodoménjeiben keletkezik rövid ideig tartó Ca^{2+} oszcilláció, ami a feltételezhetően szükséges a kalpain aktivációhoz és a sejtciklus tovább haladásához. Hasonló mechanizmust írtak le muslica embriók szincitális sejtjeiben [159]. Ezt erősíti egy nemrég megjelent tanulmány, amely szerint a nukleoplazmában megjelenő Ca^{2+} csúcsok fontosabbak az osztódás szempontjából, mint a citoplazmában detektálható Ca^{2+} szint változások. Ezek játszanak szerepet az osztódásban, legfőképpen a korai profázison történő áthaladáshoz elengedhetetlenek [160]. Egy korábbi megfigyelés szerint, ugyanakkor a magi Ca^{2+} jelek inkább a mitózis alatt fontosak, előtte nem. Másrészt ugyan ennek a tanulmánynak az állítása szerint a citoplazmában és a magban történő Ca^{2+} jelek, más transzkripciósfaktorokat aktiválnak [5]. Összességében, elmondható, hogy a Ca^{2+} jelek térbeli mintázata kulcsfontosságú.

A Ca^{2+} -függő jelátviteli folyamatok daganatos sejtekben gyakran módosulnak, és a sejtek képessé válnak a folyamatok osztódásra, és kikerülik a sejthalált. Az onkogén-függő utak gyakran átalakítják a Ca^{2+} jeleket, és a Ca^{2+} jelek is visszahatnak az onkogén közvetítette jelpályákra [161]. A SERCA és PMCA pumpák transzkripciós változásáról humán daganatokban több klinikai vizsgálatban beszámoltak [161]. Az egyes daganatokban a normál szövetekhez képest magasabb illetve alacsonyabb PMCA és SERCA pumpa expresszióra egyaránt van példa. A Ca^{2+} jelátvitel másik szereplőjének, a kalpain-kalpasztatin rendszer egyensúlyának változására is számos példa akad daganatos sejtekben [162, 163]. Eredményeink felvetnek egy olyan Ca^{2+} -függő szabályozás lehetőségét, amellyel a csontvelői sejtek megmenekülhetnek a hormon megvonással előidézhető sejthaláltól. Összhangban elképzelésünkkel, a TF-1 sejtekben ionomycin kezelés Epo R kifejeződés csökkenést vált ki [164] ami jelzi, hogy a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedés hatására a sejtek osztódás irányába köteleződnek el, és a differenciációháttérbe szorul. A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedéssel kiváltható hormon-független túlélés klónszelekcióhoz, és kóros folyamatok elindulásához vezethet. A szelektív nagy mértékű $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedés éppen ellenkezőleg hat, és sejthalálhoz vezet. Az élet és halál jelátviteli útvonalak egyensúlyának felborulása okozza a rákos sejtek kialakulását, növekedési előnyét és túlélésüket. A daganat sejtek gyakran „addiktívek” lesznek egy vagy néhány túlélési jelpályára, és ezért védtelenebbeké válnak az azt érintő kemoterápiás szerrel szemben. Nagyarányú klinikai kutatások folynak, a daganatos sejtek Ca^{2+} háztartásának célzott felborítására, hogy apoptózist kiváltsanak. A gyógyszerfejlesztések több irányból is megközelítik a Ca^{2+} szabályozás résztvevőit pl. a kalcium pumpák, csatornákra és kalpain [165] gátlószereken keresztül.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Legfontosabb eredményeim a következők:

1. Elsőként mutattam be, hogy az átmeneti $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés, a Ca^{2+} -jel nagyságától és időtartalmától függően, sejtosztódási illetve túlélési folyamatokat indított el humán hemopoetikus sejtekben, míg hosszan tartó $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés apoptózishoz vezetett.
2. Megmutattam, hogy a Ca^{2+} indukálta homon-független túlélésben a Bcl-2 anti-apoptotikus fehérje expresszió növekedés játszik fontos szerepet.
3. Kimutattam, hogy a TF-1 sejtek CPA-val és ionomycinnel előidézhető hormon-független túlélésében a MEK/ERK/Elk-1 jelátviteli út kulcsfontosságú. Összefüggést mutattam ki az ERK1/2-MAPK útvonal aktiváció kinetikája és a biológiai válasz között.
4. Megmutattam, hogy TF-1 sejtekben az ERK1/2-MAPK útvonal hosszan tartó és nagyfokú aktivációja apoptózishoz vezet függetlenül az aktiváció kiváltásának módjától.
5. Megfigyeltem, hogy a kalpain specifikus gátlásával a TF-1 sejtek osztódása reverzibilisen leállítható anélkül, hogy a sejtek túlélését befolyásolnánk.
6. A kalpain specifikus gátlása a sejtciklus minden szakaszát érinti. Elsőként mutattam meg, hogy a G1/S, és a mitózis egyes szakaszai mellett, a kalpain gátlása az S fázison történő áthaladást is lassítja.
7. Modell rendszeremben a kalpain nem befolyásolta az ERK1/2-MAPK útvonal aktiválódását.

7.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenek előtt szeretném megköszönni Apáti Ágotának és Tompa Péternek a töretlen támogatását, biztatást és bizalmat, ami nélkül ez a dolgozat nem jött volna létre. Köszönöm segítségüket a munkában, a szakmai megbeszéléseket és kritikákat, hogy alaposan átolvasták a dolgozatomat és nem utolsó sorban az elnéző baráti mosolyokat.

Nagyon hálás vagyok Dr Friedrich Péternek, témavezetőmnek, hogy lehetővé tette a munka elvégzését, köszönöm a szakmai irányítást és, hogy finoman teregette a gondolataimat.

Nagyon köszön Paolo Ubezio-nak, hogy fogadott laborjában és segített a kettős-festéses eljárás kivitelezésében és kiértékelésében.

Mindenképpen szeretném megköszönni régi és jelenlegi kollégáimnak a segítséget és támogatást és érdeklődését. Brózik Annának, amiért időnként az éjszakai mintavételek alkalmával is bejött szórakoztatni, Magócsi Máriának, a tanácsaiért és csoportjával a szoros együttműködésért, valamint Csizmók Verának, amiért segített a doktori eljárás útvesztőiben eligazodni. Jelenlegi munkatársaim közül különösen Krajcsi Péternek köszönöm, az elnéző, nagyvonalú humorát, a szurkolását és köszönöm, hogy levett rólam minden munkámmal kapcsolatos terhet. Köszönöm Beéry Erzsébetnek a kritikai megjegyzéseket, Lados Zsuzsának a „helyzet van” de mindig megoldjukot, Jakab Katalinnak a segítségnyújtást, Rosta Tímeának a vidámságot és kihúzom magam! Szeretném megköszönni a Solvo Biotechnológia Zrt támogatását.

Továbbá mindenképp szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak a támogatást és biztatást. Különösen szeretném megköszönni Édesapámnak, hogy segített a számára „kínai” szöveget magyarosítani. Szeretném megköszönni, Édesanyámnak, az anyai gondoskodást, nővéremnek, hogy az unszolásáy, bátyámnak, hogy van, s néha felhív; családi barátunknak Mód Annának a figyelmet, amivel minden napjaimat követte; Teleki Zoltánnak, hogy kedvesen elviselte a dolgozat elkészítésének zaklatott utolsó heteit, és még a vasalót is megfogta. Nem utolsó sorban szeretném megköszönni Dán Ádámnak a barátságát, és hogy leveite rólam az izgulás súlyos terhét. Végül szeretném megköszönni két Andi barátúmnak és Eszternek a vidám beszélgetések. Andi most te jössz☺

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Ringer, S., *A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart*. J Physiol, 1883. **4**(1): p. 29-42 3.
2. Schaefer, A., M. Magocsi, and H. Marquardt, *Signalling mechanisms in erythropoiesis: the enigmatic role of calcium*. Cell Signal, 1997. **9**(7): p. 483-95.
3. Miller, B.A., et al., *Erythropoietin stimulates a rise in intracellular-free calcium concentration in single BFU-E derived erythroblasts at specific stages of differentiation*. Blood, 1989. **73**(5): p. 1188-94.
4. Berridge, M.J., *Inositol trisphosphate and calcium signalling*. Nature, 1993. **361**(6410): p. 315-25.
5. Clapham, D.E., *Calcium signaling*. Cell, 1995. **80**(2): p. 259-68.
6. Tompa, P., R. Toth-Boconadi, and P. Friedrich, *Frequency decoding of fast calcium oscillations by calpain*. Cell Calcium, 2001. **29**(3): p. 161-70.
7. De Koninck, P. and H. Schulman, *Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations [see comments]*. Science, 1998. **279**(5348): p. 227-30.
8. Simon, V.R. and M.F. Moran, *SERCA activity is required for timely progression through G1/S*. Cell Prolif, 2001. **34**(1): p. 15-30.
9. Perris, A.D. and J.F. Whitfield, *Calcium and the control of mitosis in the mammal*. Nature, 1967. **216**(5122): p. 1350-1.
10. Pande, G., N.A. Kumar, and P.S. Manogaran, *Flow cytometric study of changes in the intracellular-free calcium during the cell cycle*. Cytometry, 1996. **24**(1): p. 55-63.
11. Santella, L., *The role of calcium in the cell cycle: facts and hypotheses*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **244**(2): p. 317-24.
12. Kahl, C.R. and A.R. Means, *Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways*. Endocr Rev, 2003. **24**(6): p. 719-36.
13. Takuwa, N., et al., *Ca(2+)-dependent stimulation of retinoblastoma gene product phosphorylation and p34cdc2 kinase activation in serum-stimulated human fibroblasts*. J Biol Chem, 1993. **268**(1): p. 138-45.
14. Flory, M.R., et al., *Identification of a human centrosomal calmodulin-binding protein that shares homology with pericentrin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(11): p. 5919-23.
15. Matsumoto, Y. and J.L. Maller, *Calcium, calmodulin, and CaMKII requirement for initiation of centrosome duplication in Xenopus egg extracts*. Science, 2002. **295**(5554): p. 499-502.
16. Whitaker, M., *Cell cycle. Sharper than a needle*. Nature, 1993. **366**(6452): p. 211-2.
17. McIntosh, J.R. and M.P. Koonce, *Mitosis*. Science, 1989. **246**(4930): p. 622-8.
18. Means, A.R. and C.D. Rasmussen, *Calcium, calmodulin and cell proliferation*. Cell Calcium, 1988. **9**(5-6): p. 313-9.
19. Morris, T.A., R.J. DeLorenzo, and R.M. Tombes, *CaMK-II inhibition reduces cyclin D1 levels and enhances the association of p27kip1 with Cdk2 to cause G1 arrest in NIH 3T3 cells*. Exp Cell Res, 1998. **240**(2): p. 218-27.
20. Khanna, A.K. and J.D. Hosenpud, *Cyclosporine induces the expression of the cyclin inhibitor p21*. Transplantation, 1999. **67**(9): p. 1262-8.
21. Marshall, M.S., *Ras target proteins in eukaryotic cells*. Faseb J, 1995. **9**(13): p. 1311-8.

22. McCubrey, J.A., et al., *Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(8): p. 1263-84.
23. Zheng, C.F. and K.L. Guan, *Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues*. Embo J, 1994. **13**(5): p. 1123-31.
24. Butch, E.R. and K.L. Guan, *Characterization of ERK1 activation site mutants and the effect on recognition by MEK1 and MEK2*. J Biol Chem, 1996. **271**(8): p. 4230-5.
25. Roovers, K. and R.K. Assoian, *Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery*. Bioessays, 2000. **22**(9): p. 818-26.
26. Chang, F. and J.A. McCubrey, *P21(Cip1) induced by Raf is associated with increased Cdk4 activity in hematopoietic cells*. Oncogene, 2001. **20**(32): p. 4354-64.
27. Hoyle, P.E., et al., *Differential abilities of the Raf family of protein kinases to abrogate cytokine dependency and prevent apoptosis in murine hematopoietic cells by a MEK1-dependent mechanism*. Leukemia, 2000. **14**(4): p. 642-56.
28. Chang, F., L.S. Steelman, and J.A. McCubrey, *Raf-induced cell cycle progression in human TF-1 hematopoietic cells*. Cell Cycle, 2002. **1**(3): p. 220-6.
29. Goll, D.E., et al., *The calpain system*. Physiol Rev, 2003. **83**(3): p. 731-801.
30. Averna, M., et al., *Changes in calpastatin localization and expression during calpain activation: a new mechanism for the regulation of intracellular Ca(2+)-dependent proteolysis*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(12): p. 2669-78.
31. Melloni, E., et al., *Association of calpastatin with inactive calpain: a novel mechanism to control the activation of the protease?* J Biol Chem, 2006. **281**(34): p. 24945-54.
32. Averna, M., et al., *Interaction between catalytically inactive calpain and calpastatin. Evidence for its occurrence in stimulated cells*. Febs J, 2006. **273**(8): p. 1660-8.
33. Strobl, S., et al., *The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(2): p. 588-92.
34. Tompa, P., et al., *Domain III of calpain is a ca2+-regulated phospholipid-binding domain*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **280**(5): p. 1333-9.
35. Alexa, A., et al., *Contribution of distinct structural elements to activation of calpain by Ca2+ ions*. J Biol Chem, 2004. **279**(19): p. 20118-26.
36. Friedrich, P., *The intriguing Ca2+ requirement of calpain activation*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **323**(4): p. 1131-3.
37. Friedrich, P. and Z. Bozoky, *Digestive versus regulatory proteases: on calpain action in vivo*. Biol Chem, 2005. **386**(7): p. 609-12.
38. Baki, A., et al., *Autolysis parallels activation of mu-calpain*. Biochem J, 1996. **318**(Pt 3): p. 897-901.
39. Tompa, P., et al., *Calpastatin subdomains A and C are activators of calpain*. J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 9022-6.
40. Banoczi, Z., et al., *Synthesis of cell-penetrating conjugates of calpain activator peptides*. Bioconjug Chem, 2007. **18**(1): p. 130-7.
41. Yamamoto, A.M., et al., *N-terminus cleavage of bcl-2 by a novel cellular non-ICE cysteine proteinase*. Leukemia, 1998. **12**(9): p. 1467-72.
42. Gao, G. and Q.P. Dou, *N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death*. J Cell Biochem, 2000. **80**(1): p. 53-72.
43. Ruiz-Vela, A., G. Gonzalez de Buitrago, and A.C. Martinez, *Implication of calpain in caspase activation during B cell clonal deletion*. Embo J, 1999. **18**(18): p. 4988-98.
44. Wolf, B.B., et al., *Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis-like events during platelet activation*. Blood, 1999. **94**(5): p. 1683-92.

45. Nakagawa, T. and J. Yuan, *Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis*. J Cell Biol, 2000. **150**(4): p. 887-94.
46. Wan, T.C., M. Zabe, and W.L. Dean, *Plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 4b is phosphorylated on tyrosine 1176 in activated human platelets*. Thromb Haemost, 2003. **89**(1): p. 122-31.
47. Pariat, M., et al., *The sensitivity of c-Jun and c-Fos proteins to calpains depends on conformational determinants of the monomers and not on formation of dimers*. Biochem J, 2000. **345 Pt 1**: p. 129-38.
48. Zhang, W., et al., *Inhibition of the growth of WI-38 fibroblasts by benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-Tyr diazomethyl ketone: evidence that cleavage of p53 by a calpain-like protease is necessary for G1 to S-phase transition*. Oncogene, 1997. **14**(3): p. 255-63.
49. Choi, Y.H., et al., *Regulation of cyclin D1 by calpain protease*. J Biol Chem, 1997. **272**(45): p. 28479-84.
50. Khan, Q.A., A. Dipple, and L.M. Anderson, *Protease inhibitor-induced stabilization of p21 (waf1/cip1) and cell-cycle arrest in chemical carcinogen-exposed mammary and lung cells*. Mol Carcinog, 2002. **33**(1): p. 1-8.
51. Patel, Y.M. and M.D. Lane, *Mitotic clonal expansion during preadipocyte differentiation: calpain-mediated turnover of p27*. J Biol Chem, 2000. **275**(23): p. 17653-60.
52. Jang, J.S. and Y.H. Choi, *Proteolytic degradation of the retinoblastoma family protein p107: A putative cooperative role of calpain and proteasome*. Int J Mol Med, 1999. **4**(5): p. 487-92.
53. Vanderklish, P., et al., *Proteolysis of spectrin by calpain accompanies theta-burst stimulation in cultured hippocampal slices*. Brain Res Mol Brain Res, 1995. **32**(1): p. 25-35.
54. Carragher, N.O., B.D. Fonseca, and M.C. Frame, *Calpain activity is generally elevated during transformation but has oncogene-specific biological functions*. Neoplasia, 2004. **6**(1): p. 53-73.
55. Gebrosky, N., et al., *m-Calpain activation/depletion is associated with androgen-induced reduction of protein kinase C and proliferation of male accessory sex organ smooth muscle cells*. J Urol, 1997. **157**(2): p. 662-8.
56. Kuchay, S.M., et al., *Double knockouts reveal that protein tyrosine phosphatase 1B is a physiological target of calpain-1 in platelets*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(17): p. 6038-52.
57. Tompa, P., et al., *On the sequential determinants of calpain cleavage*. J Biol Chem, 2004. **279**(20): p. 20775-85.
58. Sprague, C.R., et al., *Phosphoinositide binding to the substrate regulates susceptibility to proteolysis by calpain*. J Biol Chem, 2008. **283**(14): p. 9217-23.
59. Murray, E.J., et al., *E64d, a membrane-permeable cysteine protease inhibitor, attenuates the effects of parathyroid hormone on osteoblasts in vitro*. Metabolism, 1997. **46**(9): p. 1090-4.
60. Mellgren, R.L., *Evidence for participation of a calpain-like cysteine protease in cell cycle progression through late G1 phase*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **236**(3): p. 555-8.
61. Schoenwaelder, S.M. and K. BurrIDGE, *Evidence for a calpeptin-sensitive protein-tyrosine phosphatase upstream of the small GTPase Rho. A novel role for the calpain inhibitor calpeptin in the inhibition of protein-tyrosine phosphatases*. J Biol Chem, 1999. **274**(20): p. 14359-67.
62. Ariyoshi, H., et al., *Possible involvement of m-calpain in vascular smooth muscle cell proliferation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(3): p. 493-8.

63. Kwak, K.B., et al., *Cell-penetrating inhibitors of calpain block both membrane fusion and filamin cleavage in chick embryonic myoblasts*. FEBS Lett, 1993. **323**(1-2): p. 151-4.
64. Dietrich, C., et al., *p53-dependent cell cycle arrest induced by N-acetyl-L-leuciny-L-leuciny-L-norleucinal in platelet-derived growth factor-stimulated human fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 10815-9.
65. Kitamura, T., et al., *Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin*. J Cell Physiol, 1989. **140**(2): p. 323-34.
66. Testa, U., et al., *Terminal megakaryocytic differentiation of TF-1 cells is induced by phorbol esters and thrombopoietin and is blocked by expression of PML/RARalpha fusion protein*. Leukemia, 1998. **12**(4): p. 563-70.
67. Kolonics, A., et al., *Activation of Raf/ERK1/2 MAP kinase pathway is involved in GM-CSF-induced proliferation and survival but not in erythropoietin-induced differentiation of TF-1 cells*. Cell Signal, 2001. **13**(10): p. 743-54.
68. Kitamura, T., F. Takaku, and A. Miyajima, *IL-1 up-regulates the expression of cytokine receptors on a factor-dependent human hemopoietic cell line, TF-1*. Int Immunol, 1991. **3**(6): p. 571-7.
69. Itoh, A., et al., *A soluble CAR-SCF fusion protein improves adenoviral vector-mediated gene transfer to c-Kit-positive hematopoietic cells*. J Gene Med, 2003. **5**(11): p. 929-40.
70. Baxter, G.T., et al., *PKC epsilon is involved in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor signal transduction: evidence from microphysiometry and antisense oligonucleotide experiments*. Biochemistry, 1992. **31**(45): p. 10950-4.
71. Rajotte, D., et al., *Contribution of both STAT and SRF/TCF to c-fos promoter activation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. Blood, 1996. **88**(8): p. 2906-16.
72. Zhang, M.Y., et al., *NF-kappaB transcription factors are involved in normal erythropoiesis*. Blood, 1998. **91**(11): p. 4136-44.
73. Kwon, E.M., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulation results in phosphorylation of cAMP response element-binding protein through activation of pp90RSK*. Blood, 2000. **95**(8): p. 2552-8.
74. Miller, B.A., et al., *Role of pertussis toxin-sensitive guanosine triphosphate-binding proteins in the response of erythroblasts to erythropoietin*. Blood, 1991. **77**(3): p. 486-92.
75. Schaefer, A., et al., *Ca2+/calmodulin-dependent and -independent down-regulation of c-myc mRNA levels in erythropoietin-responsive murine erythroleukemia cells. The role of calcineurin*. J Biol Chem, 1996. **271**(23): p. 13484-90.
76. Tsien, R.Y., T. Pozzan, and T.J. Rink, *Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator*. J Cell Biol, 1982. **94**(2): p. 325-34.
77. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
78. Askew, D.S., et al., *Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis*. Oncogene, 1991. **6**(10): p. 1915-22.
79. Darzynkiewicz Z, J.G., *Nucleic Acid Analysis*, in *Current Protocols in Cytometry*. 1997, John Wiley and Sons, Inc. p. 7.7.1- 7.7.6.

80. Apati, A., et al., *Calcium induces cell survival and proliferation through the activation of the MAPK pathway in a human hormone-dependent leukemia cell line, TF-1*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9235-43.
81. Trump, B.F., et al., *The role of calcium in cell injury. A review*. Scan Electron Microsc, 1980(Pt 2): p. 437-62, 492.
82. Berridge, M.J., *Calcium signalling and cell proliferation*. Bioessays, 1995. **17**(6): p. 491-500.
83. Rodriguez-Tarduchy, G., M. Collins, and A. Lopez-Rivas, *Regulation of apoptosis in interleukin-3-dependent hemopoietic cells by interleukin-3 and calcium ionophores*. Embo J, 1990. **9**(9): p. 2997-3002.
84. Rodriguez-Tarduchy, G., et al., *Inhibition of apoptosis by calcium ionophores in IL-3-dependent bone marrow cells is dependent upon production of IL-4+*. J Immunol, 1992. **148**(5): p. 1416-22.
85. Palaga, T., et al., *Suppression of apoptotic cell death of IL-3-dependent cell lines by ER/SR Ca²⁺-ATPase inhibitors upon IL-3 deprivation*. Exp Cell Res, 1996. **228**(1): p. 92-7.
86. Lotem, J. and L. Sachs, *Different mechanisms for suppression of apoptosis by cytokines and calcium mobilizing compounds*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): p. 4601-6.
87. Koshikawa, N., et al., *Expression of trypsin by epithelial cells of various tissues, leukocytes, and neurons in human and mouse*. Am J Pathol, 1998. **153**(3): p. 937-44.
88. Koshikawa, N., et al., *Multiple secretion of matrix serine proteinases by human gastric carcinoma cell lines*. Cancer Res, 1992. **52**(18): p. 5046-53.
89. Shukla, N., et al., *Calcium and the replication of human vascular smooth muscle cells: studies on the activation and translocation of extracellular signal regulated kinase (ERK) and cyclin D1 expression*. Eur J Pharmacol, 2005. **509**(1): p. 21-30.
90. Alvarado-Moreno, J.A., M.E. Nieves-Ramirez, and J.R. Caceres-Cortes, *[Transfection of TF-1 cell line with human bcl-2 proto-oncogene provides short-term survival in absence of GM-CSF without changing the phenotype]*. Rev Invest Clin, 2000. **52**(6): p. 645-53.
91. Choi, H.J. and T.E. Smithgall, *HIV-1 Nef promotes survival of TF-1 macrophages by inducing Bcl-XL expression in an extracellular signal-regulated kinase-dependent manner*. J Biol Chem, 2004. **279**(49): p. 51688-96.
92. Ren, Y., et al., *Shp2E76K mutant confers cytokine-independent survival of TF-1 myeloid cells by up-regulating Bcl-XL*. J Biol Chem, 2007. **282**(50): p. 36463-73.
93. Rong, Y. and C.W. Distelhorst, *Bcl-2 protein family members: versatile regulators of calcium signaling in cell survival and apoptosis*. Annu Rev Physiol, 2008. **70**: p. 73-91.
94. Pinton, P., et al., *Reduced loading of intracellular Ca(2+) stores and downregulation of capacitative Ca(2+) influx in Bcl-2-overexpressing cells*. J Cell Biol, 2000. **148**(5): p. 857-62.
95. Foyouzi-Youssefi, R., et al., *Bcl-2 decreases the free Ca²⁺ concentration within the endoplasmic reticulum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(11): p. 5723-8.
96. Chen, R., et al., *Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate*. J Cell Biol, 2004. **166**(2): p. 193-203.
97. Zhong, F., et al., *Bcl-2 differentially regulates Ca²⁺ signals according to the strength of T cell receptor activation*. J Cell Biol, 2006. **172**(1): p. 127-37.
98. White, C., et al., *The endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-X(L) modulation of the InsP3R*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(10): p. 1021-8.

99. Chao, J.R., et al., *Characterization of factor-independent variants derived from TF-1 hematopoietic progenitor cells: the role of the Raf/MAP kinase pathway in the anti-apoptotic effect of GM-CSF*. *Oncogene*, 1997. **14**(6): p. 721-8.
100. Boucher, M.J., et al., *MEK/ERK signaling pathway regulates the expression of Bcl-2, Bcl-X(L), and Mcl-1 and promotes survival of human pancreatic cancer cells*. *J Cell Biochem*, 2000. **79**(3): p. 355-69.
101. Yuan, P.X., et al., *The mood stabilizer valproic acid activates mitogen-activated protein kinases and promotes neurite growth*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(34): p. 31674-83.
102. Woods, N.M., K.S. Cuthbertson, and P.H. Cobbold, *Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes*. *Nature*, 1986. **319**(6054): p. 600-2.
103. Balmanno, K. and S.J. Cook, *Sustained MAP kinase activation is required for the expression of cyclin D1, p21Cip1 and a subset of AP-1 proteins in CCL39 cells*. *Oncogene*, 1999. **18**(20): p. 3085-97.
104. He, X.Q., et al., *Biphasic effect of arsenite on cell proliferation and apoptosis is associated with the activation of JNK and ERK1/2 in human embryo lung fibroblast cells*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007. **220**(1): p. 18-24.
105. Kinoshita, T., et al., *Regulation of Bcl-2 expression by oncogenic Ras protein in hematopoietic cells*. *Oncogene*, 1995. **10**(11): p. 2207-12.
106. Fang, X., et al., *Regulation of BAD phosphorylation at serine 112 by the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway*. *Oncogene*, 1999. **18**(48): p. 6635-40.
107. Jones, S.M. and A. Kazlauskas, *Growth-factor-dependent mitogenesis requires two distinct phases of signalling*. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(2): p. 165-72.
108. Weber, J.D., et al., *Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase*. *Biochem J*, 1997. **326** (Pt 1): p. 61-8.
109. Shatos, M.A., et al., *ERK/p44p42 Mitogen-activated Protein Kinase Mediates EGF-stimulated Proliferation of Conjunctival Goblet Cells in Culture*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008.
110. Chen, W.N., et al., *Induced autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor contributes to the response of mammary epithelial cells to tumor necrosis factor alpha*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(18): p. 18488-96.
111. Cordes, T., et al., *Modulation of MAPK ERK1 and ERK2 in VDR-positive and -negative breast cancer cell lines*. *Anticancer Res*, 2006. **26**(4A): p. 2749-53.
112. Cook, J.G., L. Bardwell, and J. Thorner, *Inhibitory and activating functions for MAPK Kss1 in the S. cerevisiae filamentous-growth signalling pathway*. *Nature*, 1997. **390**(6655): p. 85-8.
113. Raman, M., W. Chen, and M.H. Cobb, *Differential regulation and properties of MAPKs*. *Oncogene*, 2007. **26**(22): p. 3100-12.
114. Brown, L. and S. Benchimol, *The involvement of MAPK signaling pathways in determining the cellular response to p53 activation: cell cycle arrest or apoptosis*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(7): p. 3832-40.
115. Zhang, J. and H.F. Lodish, *Constitutive activation of the MEK/ERK pathway mediates all effects of oncogenic H-ras expression in primary erythroid progenitors*. *Blood*, 2004. **104**(6): p. 1679-87.
116. Yuan, Z., et al., *The duration of nuclear extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 signaling during cell cycle reentry distinguishes proliferation from apoptosis in response to asbestos*. *Cancer Res*, 2004. **64**(18): p. 6530-6.

117. Wang, X., E.A. Clubbs, and J.A. Bomser, *Genistein modulates prostate epithelial cell proliferation via estrogen- and extracellular signal-regulated kinase-dependent pathways*. J Nutr Biochem, 2006. **17**(3): p. 204-10.
118. Peter, M., *The regulation of cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs)*. Prog Cell Cycle Res, 1997. **3**: p. 99-108.
119. Gorbisky, G.J., *Cell cycle checkpoints: arresting progress in mitosis*. Bioessays, 1997. **19**(3): p. 193-7.
120. Santella, L., et al., *Calcium, protease action, and the regulation of the cell cycle*. Cell Calcium, 1998. **23**(2-3): p. 123-30.
121. Gabrilove, J.L., *Angiogenic growth factors: autocrine and paracrine regulation of survival in hematologic malignancies*. Oncologist, 2001. **6 Suppl 5**: p. 4-7.
122. Heinrich, M.C., et al., *Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor*. Blood, 2000. **96**(3): p. 925-32.
123. March, K.L., et al., *Effects of thiol protease inhibitors on cell cycle and proliferation of vascular smooth muscle cells in culture*. Circ Res, 1993. **72**(2): p. 413-23.
124. Wang, K.K., et al., *An alpha-mercaptoacrylic acid derivative is a selective nonpeptide cell-permeable calpain inhibitor and is neuroprotective*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(13): p. 6687-92.
125. Van den Bosch, L., et al., *An alpha-mercaptoacrylic acid derivative (PDI50606) inhibits selective motor neuron death via inhibition of kainate-induced Ca²⁺ influx and not via calpain inhibition*. Neuropharmacology, 2002. **42**(5): p. 706-13.
126. Xu, Y. and R.L. Mellgren, *Calpain inhibition decreases the growth rate of mammalian cell colonies*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21474-9.
127. Cuevas, B.D., et al., *MEKK1 regulates calpain-dependent proteolysis of focal adhesion proteins for rear-end detachment of migrating fibroblasts*. Embo J, 2003. **22**(13): p. 3346-55.
128. Glading, A., et al., *Epidermal growth factor receptor activation of calpain is required for fibroblast motility and occurs via an ERK/MAP kinase signaling pathway*. J Biol Chem, 2000. **275**(4): p. 2390-8.
129. Glading, A., et al., *Membrane proximal ERK signaling is required for M-calpain activation downstream of epidermal growth factor receptor signaling*. J Biol Chem, 2001. **276**(26): p. 23341-8.
130. Glading, A., et al., *Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(6): p. 2499-512.
131. Leloup, L., et al., *Involvement of the ERK/MAP kinase signalling pathway in milli-calpain activation and myogenic cell migration*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(6): p. 1177-89.
132. Carragher, N.O., et al., *A novel role for FAK as a protease-targeting adaptor protein: regulation by p42 ERK and Src*. Curr Biol, 2003. **13**(16): p. 1442-50.
133. Amadoro, G., et al., *Substance P provides neuroprotection in cerebellar granule cells through Akt and MAPK/Erk activation: evidence for the involvement of the delayed rectifier potassium current*. Neuropharmacology, 2007. **52**(6): p. 1366-77.
134. Wang, X., et al., *Activation of ERK1/2 after neonatal rat cerebral hypoxia-ischaemia*. J Neurochem, 2003. **86**(2): p. 351-62.
135. Witkowski, J.M. and E. Bryl, *Paradoxical age-related cell cycle quickening of human CD4(+) lymphocytes: a role for cyclin D1 and calpain*. Exp Gerontol, 2004. **39**(4): p. 577-85.
136. Carragher, N.O., et al., *v-Src-induced modulation of the calpain-calpastatin proteolytic system regulates transformation*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(1): p. 257-69.

137. Kubbutat, M.H. and K.H. Vousden, *Proteolytic cleavage of human p53 by calpain: a potential regulator of protein stability*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(1): p. 460-8.
138. Benetti, R., et al., *The death substrate Gas2 binds m-calpain and increases susceptibility to p53-dependent apoptosis*. Embo J, 2001. **20**(11): p. 2702-14.
139. Cui, Q., et al., *P53-mediated cell cycle arrest and apoptosis through a caspase-3-independent, but caspase-9-dependent pathway in oridonin-treated MCF-7 human breast cancer cells*. Acta Pharmacol Sin, 2007. **28**(7): p. 1057-66.
140. Bernal, J.A. and A. Hernandez, *p53 stabilization can be uncoupled from its role in transcriptional activation by loss of PTTG1/securin*. J Biochem, 2007. **141**(5): p. 737-45.
141. Raynaud, F., et al., *m-Calpain implication in cell cycle during muscle precursor cell activation*. Exp Cell Res, 2004. **298**(1): p. 48-57.
142. Zhang, R., N.L. Banik, and S.K. Ray, *Combination of all-trans retinoic acid and interferon-gamma upregulated p27(kip1) and down regulated CDK2 to cause cell cycle arrest leading to differentiation and apoptosis in human glioblastoma LN18 (PTEN-proficient) and U87MG (PTEN-deficient) cells*. Cancer Chemother Pharmacol, 2007.
143. Joy, J., et al., *Identification of calpain cleavage sites in the G1 cyclin-dependent kinase inhibitor p19(INK4d)*. Biol Chem, 2006. **387**(3): p. 329-35.
144. Le, X.F., et al., *The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in anti-HER2 antibody-induced G1 cell cycle arrest and tumor growth inhibition*. J Biol Chem, 2003. **278**(26): p. 23441-50.
145. Concha, C., et al., *Inhibition of cysteine protease activity disturbs DNA replication and prevents mitosis in the early mitotic cell cycles of sea urchin embryos*. J Cell Physiol, 2005. **204**(2): p. 693-703.
146. Pelley, R.P., et al., *Calmodulin-androgen receptor (AR) interaction: calcium-dependent, calpain-mediated breakdown of AR in LNCaP prostate cancer cells*. Cancer Res, 2006. **66**(24): p. 11754-62.
147. Joe, A.K., et al., *Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(3): p. 893-903.
148. Blagosklonny, M.V., et al., *Regulation of BRCA1 by protein degradation*. Oncogene, 1999. **18**(47): p. 6460-8.
149. Miralem, T. and H.K. Avraham, *Extracellular matrix enhances heregulin-dependent BRCA1 phosphorylation and suppresses BRCA1 expression through its C terminus*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(2): p. 579-93.
150. Gautier, F., et al., *Identification of an apoptotic cleavage product of BARD1 as an autoantigen: a potential factor in the antitumoral response mediated by apoptotic bodies*. Cancer Res, 2000. **60**(24): p. 6895-900.
151. Deng, C.X., *BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(5): p. 1416-26.
152. Schollmeyer, J.E., *Calpain II involvement in mitosis*. Science, 1988. **240**(4854): p. 911-3.
153. Yamaguchi, R., et al., *Unphosphorylated and tyrosine-phosphorylated forms of a focal adhesion protein, paxillin, are substrates for calpain II in vitro: implications for the possible involvement of calpain II in mitosis-specific degradation of paxillin*. FEBS Lett, 1994. **356**(1): p. 114-6.
154. Garcia-Morales, P., et al., *Inhibition of Hsp90 function by ansamycins causes downregulation of cdc2 and cdc25c and G(2)/M arrest in glioblastoma cell lines*. Oncogene, 2007. **26**(51): p. 7185-93.

155. Lane, R.D., D.M. Allan, and R.L. Mellgren, *A comparison of the intracellular distribution of mu-calpain, m-calpain, and calpastatin in proliferating human A431 cells*. Exp Cell Res, 1992. **203**(1): p. 5-16.
156. Santella, L., et al., *Breakdown of cytoskeletal proteins during meiosis of starfish oocytes and proteolysis induced by calpain*. Exp Cell Res, 2000. **259**(1): p. 117-26.
157. Honda, S., et al., *Activation of m-calpain is required for chromosome alignment on the metaphase plate during mitosis*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 10615-23.
158. Niapour, M. and S. Berger, *Flow cytometric measurement of calpain activity in living cells*. Cytometry A, 2007. **71**(7): p. 475-85.
159. Whitaker, M., *Calcium microdomains and cell cycle control*. Cell Calcium, 2006. **40**(5-6): p. 585-92.
160. Rodrigues, M.A., et al., *Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation*. J Biol Chem, 2007. **282**(23): p. 17061-8.
161. Roderick, H.L. and S.J. Cook, *Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(5): p. 361-75.
162. Rios-Doria, J., et al., *Cleavage of beta-catenin by calpain in prostate and mammary tumor cells*. Cancer Res, 2004. **64**(20): p. 7237-40.
163. Lakshmikuttyamma, A., et al., *Overexpression of m-calpain in human colorectal adenocarcinomas*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2004. **13**(10): p. 1604-9.
164. Winter, S.S., T. Howard, and R.E. Ware, *Regulation of expression of the human erythropoietin receptor gene*. Blood Cells Mol Dis, 1996. **22**(3): p. 214-24; discussion 224a.
165. Guan, N., et al., *Apoptosis induced by novel aldehyde calpain inhibitors in human tumor cell lines*. Int J Oncol, 2006. **29**(3): p. 655-63.

9. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

Janossy J, Ubezio P, Apati A, Magocsi M, Tompa P, Friedrich P. „Calpain as a multi-site regulator of cell cycle.” **2004** *Biochem Pharmacol.*;67(8):1513-21.

Apati A, **Janossy J**, Brozik A, Magocsi M. **2003** „Effects of intracellular calcium on cell survival and the MAPK pathway in a human hormone-dependent leukemia cell line (TF-1).” *Ann N Y Acad Sci.* 1010:70-3.

Apati, A.; **Janossy, J.**; Brozik, A.; Bauer, P. I.; Magocsi, M. **2003.** „Calcium induces cell survival and proliferation through the activation of the MAPK pathway in a human hormone-dependent leukemia cell line, TF-1.” *J Biol Chem*, 278(11): p. 9235-43.

Egyéb közlemények:

Kis E, Nagy T, Jani M, Molnár E, **Jánossy J**, Ujhelly O, Németh K, Herédi-Szabó K, Krajcsi P. **2008** „Leflunomide and A771726, its metabolite are high affinity substrates of BCRP - implications for drug resistance.” *Ann Rheum Dis.* Apr 8.

Kolonics, A.; Apati, A.; **Janossy, J.**; Brozik, A.; Gati, R.; Schaefer, A.; Magocsi, M. **2001** „Activation of Raf/ERK1/2 MAP kinase pathway is involved in GM-CSF-induced proliferation and survival but not in erythropoietin-induced differentiation of TF-1 cells.” *Cell Signal.*, 13(10): p. 743-54.

Urge-Vorsatz, D., Mez, L., Miladinova, G., Antypas, A., Bursik, **Janossy, J.**, M., Baniak, A., Drucker, D., and Nezamoutinova, D. **2003.** *The impact of structural changes in the energy sector of CEE countries on the creation of a sustainable energy path. Special focus on investments in environmentally friendly energies and impact of such a sustainable energy path on employment and access conditions for low-income consumers* (Project No IV/2002/07/03). <http://www.ceu.hu/envsci/research/ep.htm>

Könyv fejezet

M. Bollók, J. Jánossy, P. Krajcsi: „ABC transporters in the blood -brain-barrier - Relevance in stroke.” In: *Recent advances and new strategies in stroke research*, Ed: Franciska Erdő, Research Signpost, 2008.

10. ÖSSZEFOGLALÓ

Olyan összetett modell rendszert alakítottunk ki, amivel az eltérő Ca^{2+} jelek által kiváltott biológiai hatásokat lehet jellemezni. A modellünkben használt humán mielo-eritroid sejtvonal szaporodása és túlélése teljes mértékben GM-CSF vagy IL-3 függő. A hormon-megvonás hatására a sejtek megállnak a növekedésben, majd apoptózissal elpusztulnak. A sejteken különböző $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedést váltottunk ki: SERCA pumpa gátlás (CPA) átmeneti mérsékelt, alacsony mennyiségű ionofórral (ionomycin) átmeneti fokozott, míg nagyobb ionfór (A23187) koncentráció hosszantartó fokozott $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedést eredményezett. A Ca^{2+} -emelkedés nagyságától és időtartalmától függően, hormon-független sejtosztódást, illetve túlélést eredményezett, míg a hosszan tartó magas Ca^{2+} szint apoptózishoz vezetett. A hormon-függő és a hormon-független túlélést egyaránt Bcl-2 anti-apoptotikus fehérje szint emelkedés és Kaszpáz-3 enzim aktivitás csökkenés kísérte. Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változással arányosan aktiválódott a MEK/ERK1/2/Elk-1/c-Fos jelátviteli pálya. Hormon megvonás hatására nem történt aktiváció, a hormon-független túlélés és osztódás azonban két-fázisú, továbbá az apoptózist fokozott, hosszantartó MEK-függő ERK1/2 és Elk-1 foszforiláció kísérte. A Ca^{2+} jelátviteli folyamatokban szerepet játszó kalpain enzim nem befolyásolta a fentiekben ismertetett Ca^{2+} által aktivált jelátviteli pályát. A dolgozatban bemutatásra került, hogy az alkalmazott modell alapján a kalpain szerepet játszik a sejtosztódásban. A kalpain specifikus gátlásával a sejt növekedés reverzibilisen leállítható, anélkül, hogy apoptózist idézne elő. Részletes elemzés alapján elsőként mutattunk rá arra, hogy a kalpain a sejtciklus összes fázisában szerepet játszik, beleértve az S fázist is. Eredményeink és az irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy a kalpain a fent részletezett jelátviteli kaszkád egy későbbi, vagy leágazó szakaszában működik közre.

Összefoglalva, a különböző $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változások teljesen eltérő biológiai hatást váltottak ki. Humán eritroid sejtekben mérsékelt Ca^{2+} szint emelkedés és MAPK aktiváció esetében hormon-független túlélést, és osztódást tapasztaltunk, hosszantartó Ca^{2+} szint emelkedés és ERK/MAP kináz aktiváció pedig sejtelhaláshoz vezetett. Munkánk eredményeként megállapítható volt a Ca^{2+} -jelátvitel egy másik elemének, a kalpainnak sejtosztódásban játszott kulcs fontosságú szerepe is. Modellünk alkalmas lehet a Ca^{2+} -háztartást modulálását célzó gyógyszerfejlesztések tesztelésére.

11. SUMMARY

We have established a complex model that allows the characterization of the biological outcomes induced by various Ca^{2+} signals. The survival and proliferation of the model cell line was fully dependent on GM-CSF or IL-3. Hormone deprivation induced cell cycle arrest followed by apoptosis. Different $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases were stimulated, whereby controlled moderate elevation caused hormone-independent cell survival, controlled high increase even induced proliferation, whereas sustained high elevation induced apoptosis. The biological outcome depended on the amplitude and duration of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation. Both hormone dependent and independent survival were accompanied by the rise of Bcl-2 levels, an anti-apoptotic protein and the decrease of the Caspase-3 enzyme activity. Observed MEK/ERK1/2/Elk-1/c-Fos pathway activations correlated with the changes in the intracellular calcium concentrations. No activation was detected with control hormone-deprived cells, whilst stimulations causing survival and proliferation displayed a biphasic activation of the pathway. Furthermore, in accordance with the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes, sustained activation of the pathway stimulated apoptosis. Calpain, a calcium-activated protease had no effect on the Ca^{2+} stimulated pathway. However, we have shown that calcium is involved in the proliferation of our model hemopoietic cell line. Cell growth could be arrested reversibly by a specific calpain inhibitor without declining the viability of the cells. The detailed analyses of the effect of calpain inhibition on the cell cycle revealed for the first time that calpain is involved in all phases of the cell cycle, including S phase. Based on our observations and the literature it can be postulated that calpain may be activated by the MEK/ERK1/2 cascade either at a distal point or by another branch of the pathway.

To sum it up, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes may display completely different outcomes. In a human erythroid cell line controlled $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevations and MAPK activations resulted in hormone-independent survival and proliferation, while sustained elevations induced apoptosis. We have concluded that calpain, another important member of the Ca^{2+} signaling pathway plays a key role in cell proliferation. We suggest that our model can be useful in drug development for screening candidate compounds that target the Ca^{2+} homeostasis of the cells.